

**Effekt av bakterieprodukter
på glukose- og fettsyremetabolisme i dyrkede
humane skjelettmuskelceller i kultur**

Masteroppgave for graden Master i farmasi



Naima Raza

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Desember 2015

**Effekt av bakterieprodukter
på glukose- og fettsyremetabolisme i dyrkede
humane skjelettmuskelceller i kultur**

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Naima Raza



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Desember 2015

Veiledere: Professor Hege Thoresen

Professor Vigdis Aas

© Naima Raza

2015

Effekt av bakterieprodukter på glukose- og fettsyremetabolisme i dyrkede humane skjelettmuskelceller i kultur.

Naima Raza

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Jeg har fullført oppgaven både ved Høgskolen i Oslo og Akershus og på seksjon for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, lokaler ved Gydas vei 8 i perioden august 2014 til desember 2015. Mesteparten av oppgaven er utført ved Gydas vei 8.

Jeg vil med dette først takke min veileder professor Vigdis Aas for god oppfølging og veiledning under skriving av oppgaven. Tusen takk for gode råd under oppgaven og for å ha tro på meg at dette vil gå bra til slutt selv under en god periode med celleinfeksjoner/utfordringer på cellelaben som nesten tok knekken på meg. En riktig stor takk til min veileder professor Hege Thoresen for veiledning. Det var hyggelig å jobbe med deg.

En stor takk rettes til stipendiat Jenny Lund for en god hjelp i forbindelse med laben. Det var hyggelig å bli kjent med alle dere i ”Muskelbunten” og med alle andre ansatte på avdelingen. En spesiell stor takk rettes til Beata for å være både hyggelig og hjelpsom for meg på laben under Western blotting.

Dessuten er jeg kjempeglad for at farmasistudiet tar sin ende siden det har vært et krevende og hardt studieløp å fullføre samtidig med å ha en familie på tre gutter. Men farmasistudiet setter sine spor med all den gode kunnskapen jeg har fått via det studieløpet som er mye verdt. Det er derfor kjent på folkemunne ” Man må jobbe hardt for å få noe igjen” .

Til slutt og ikke minst vil jeg takke min kjære Adnan som alltid har stilt opp og støttet meg gjennom hele farmasistudiet og trøstet meg i alle de vanskelige og tøffe tidene jeg måtte gå gjennom og har gjort det mulig for meg å fullføre studiet med de 3 guttene mine. Jeg må bare si til deg Adnan, til slutt, uten din støtte og tro på meg, ville jeg aldri kommet meg så langt i studiet. Dessuten fortjener mamma og pappa en stor takk som alltid sa til meg at alle ting ordner seg med tiden selv om det for noen kommer ved et senere tidspunkt enn det skulle, og de hadde alltid tro på at jeg kommer til å klare det til slutt.

Blindern, desember 2015

Naima Raza

Abstract

Background: Overweight, obesity, type 2 diabetes (T2D) is worldwide an increasing problem. Insulin resistance (IR), where insulin sensitivity is decreased and the body is not responding properly to insulin, is an early stage in the development of T2D. It is shown increased levels of cytokines and bacterial products in the bloodstream of people with obesity and T2D. It is suggested that the change in composition of intestinal microbiota, increased intestinal permeability and bacterial products in the bloodstream may activate the innate immune system and initiate inflammation and change energy metabolism in organs such as liver, adipose tissue and skeletal muscle. Altered glucose and fatty acid metabolism can further lead to IR. New research suggests that a family of pattern recognition receptors (PRRs) in the innate immune system, nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) is involved in the development of obesity, inflammation and IR. NOD1 and NOD2 are members of NLRs. In this study, NOD1 and NOD2 receptors were activated by synthetic peptidoglycans, NOD1 and NOD2 ligands, and effects on glucose and oleic acid metabolism and insulin response were examined in cultured human skeletal muscle cells.

Methods: Skeletal muscle cells were isolated from biopsies of *musculus obliquus internus abdominis* and *musculus vastus lateralis* from healthy volunteers. The cells were cultured, proliferated and differentiated into multinucleated myotubes. On day 7 of differentiation myotubes were pretreated with an unspecific NOD1/2 ligand (peptidoglycan from *E. coli* K12, PGN ECndi) or specific NOD1 (C12 dipeptide Y-D-glutamyl-mesodiaminopimelinsyre, C12-iE-DAP) or NOD2 (L18 muramyl dipeptide, L18-MDP) ligands in different concentrations for different time periods before glucose and oleic acid metabolism in human myotubes were studied. Substrate oxidation assays were performed with D-[¹⁴C(U)] glucose or [1-¹⁴C] oleic acid. Insulin-stimulated glucose uptake and Western immunoblotting were conducted to measure insulin responses in human myotubes treated by NOD ligands. Human myotubes were first pretreated with NOD-ligands for 3 hours, then stimulated with 100nM insulin for 15 min before harvesting for Western immunoblotting. The level of phosphorylated protein kinase B (Akt), which is a central downstream protein in insulin signaling pathway, was studied.

Results: NOD1- and NOD2-ligands gave effects on glucose and oleic acid metabolism in cultured human skeletal muscle cells. Both oleic acid uptake and oxidation of oleic acid were reduced by unspecific NOD1/2 and specific NOD1 ligand. NOD1-ligand (1ng /ml) reduced oleic acid oxidation by 50% after 3 hours pre-treatment, while by acute exposure to NOD1-ligand (50ng/ml) reduced oleic acid uptake and oleic acid oxidation by 16% and 18%, respectively. A specific NOD2 ligand had no effect on oleic acid metabolism. On the other hand, NOD2 ligand had effect on basal glucose metabolism, while NOD1-ligand did not produce significant effect on glucose metabolism. Basal glucose oxidation and glucose uptake were reduced by 15% and 17% after 3 hours pre-treatment with NOD2 ligand. In addition, both NOD1 and NOD2 ligands had effects on insulin-stimulated glucose uptake and oxidation and insulin-stimulated Akt phosphorylation after short pre-treatment at 50ng/ml. The effect of NOD1 and NOD2 ligands on insulin-stimulated Akt phosphorylation was however not statistically significant.

Conclusion: Bacterial products (NOD ligands) had effects on both glucose and oleic acid metabolism in cultured human skeletal muscle cells. NOD1 (C12-iE-DAP) ligand reduced oleic acid metabolism, whereas NOD2 (L18-MDP) ligand reduced basal glucose metabolism. Both NOD1 and NOD2 ligands tended to reduce insulin stimulated Akt phosphorylation. Because of few experiments and large variation between experiments, more data from additional studies are required in order to draw final conclusions. This study suggests that bacterial products such as NOD1- and NOD2-ligands can modulate glucose and fatty acid metabolism in human skeletal muscle.

Sammendrag

Bakgrunn: Overvekt, fedme, type 2-diabetes (T2D) er på verdensbasis et stadig økende problem. Insulinresistens (IR), hvor insulinfølsomheten er nedsatt og kroppen ikke reagerer slik den skal på insulin, er et forstadium i utviklingen av T2D. Det er påvist økt nivå av cytokiner og bakterieprodukter i blodbanen hos personer med fedme og T2D. Det er foreslått at endring i sammensetning av tarmmikrobiota, økt tarmpermeabilitet og bakterieprodukter i blodbanen aktiverer det medfødte immunsystemet og initierer inflammasjon og endring av energimetabolismen i organer som lever, fettvev og skjelettmuskulatur. Endret glukose- og fettsyremetabolisme kan videre føre til IR. Ny forskning tyder på at en familie av «pattern recognition receptors» (PRRs) i det medfødte immunsystemet, nukleotid-binding og oligomeriseringsdomene (NOD)-like reseptorer (NLRs) er involvert i utvikling av fedme, inflammasjon og IR. NOD1 og NOD2 er medlemmer av NLRs. I denne oppgaven ble aktivisering av NOD1- og NOD2-reseptorer ved syntetiske peptidoglykanderivater, NOD1- og NOD2-ligander, undersøkt med hensyn på regulering av glukose- og oljesyremetabolisme og insulinrespons i dyrkede humane skjelettmuskelceller.

Metode: Skjelettmuskelceller ble isolert fra biopsier fra *musculus obliquus internus abdominis* og *musculus vastus lateralis* fra friske frivillige deltakere. Cellene ble dyrket, proliferert og differensiert til flerkjernede myotuber. På differensieringsdag 7 ble myotubene forbehandlet med uspesifikk NOD1/2-ligand (peptidoglykan fra *E. coli* K12, PGN ECndi) og spesifikke NOD1-(C12 dipeptid γ -D-glutamyl-mesodiaminopimelinsyre, C12-iE-DAP) og NOD2-(L18 muramyl dipeptid, L18-MDP)-ligander i ulike konsentrasjoner i varierende antall timer før glukose- og oljesyremetabolismen i humane myotuber ble undersøkt. I substratoksidasjonsforsøkene ble D-[^{14}C (U)] glukose eller [$1\text{-}^{14}\text{C}$] oljesyre benyttet. Insulinstimulert glukoseopptak under substratoksidasjonsforsøk og Western immunblotting ble benyttet til å måle insulinresponser i NOD-ligandbehandlede humane myotuber. Humane myotuber ble først forbehandlet med NOD-ligander i 3 timer, deretter stimulert med 100nM insulin i 15 minutter før høsting til Western immunblotting. Graden av fosforylert protein kinase B (Akt), som er et sentralt protein nedstrøms i insulinsignalveien, ble studert.

Resultater: Effekter av NOD1- og NOD2-ligander ble funnet på glukose- og oljesyremetabolisme i dyrkede humane skjelettmuskelceller. Både oljesyreopptak og oljesyreoksidasjon ble redusert av uspesifikk NOD1/2- og spesifikk NOD1-ligand. NOD1-ligand (1ng/ml) reduserte oljesyreoksidasjon med ca. 50% ved 3 timers forbehandling, mens ved akutt eksponering med NOD1-ligand (50ng/ml) ble oljesyreopptak og oljesyreoksidasjon redusert med henholdsvis 16% og 18%. Spesifikk NOD2-ligand ga ikke effekter på oljesyremetabolisme. På basal glukosemetabolisme var det derimot effekter av NOD2-ligand, mens NOD1-ligand ikke ga signifikante effekter. Basal glukoseoksidasjon og glukoseopptak ble redusert med henholdsvis 15% og 17% ved 3 timers forbehandling med NOD2-ligand. I tillegg hadde NOD1- og NOD2-ligander effekt både på insulinstimulert glukoseoksidasjon og -opptak og insulinstimulert Akt-fosforylering, etter korttids forbehandling ved 50ng/ml. Effekten av NOD1- og NOD2-ligander på insulinstimulert Akt-fosforylering var imidlertid ikke statistisk signifikant.

Konklusjon: Bakterieprodukter (NOD-ligander) hadde effekter både på glukose- og oljesyremetabolisme i humane skjelettmuskelceller i kultur. NOD1 (C12-iE-DAP)-ligand reduserte oljesyremetabolismen, mens NOD2 (L18-MDP)-ligand reduserte basal glukosemetabolisme. Både NOD1- og NOD2-ligander tenderte til å redusere insulinstimulert Akt-fosforylering. Det er imidlertid få forsøk og stor variasjon mellom forsøkene og derfor nødvendig med data fra videre studier for å kunne trekke sikre konklusjoner. Denne studien tyder på at bakterieprodukter som NOD1- og NOD2-ligander kan modulere glukose- og fettsyremetabolisme i human skjelettmuskulatur.

Forkortelser

| | |
|-------|-------------------------------------------------------------|
| ACC | Acetyl-CoA karboksylase |
| ACS | Acyl-CoA syntase |
| ADP | Adenosindifosfat |
| AMPK | AMP-aktivert protein kinase |
| AP-1 | Aktivator protein- 1 |
| AS160 | Akt-substrat 160 |
| AT | Adipose tissue /fettvev |
| ATGL | Adipose triacylglycerid lipase/ Fettvevs triglycerol lipase |
| ATP | Adenosintrifosfat |
| BSA | Bovint serumalbumin |
| CA | Celleassosiert |
| CARD | Caspase recruitment domain |
| CoA | Koenzym A |
| CPT1 | Karnitin palmitoyltransferase-1 |
| DAG | Diacylglycerol |
| DMEM | ”Dulbecco’s Modified Eagle Medium” |
| DMSO | Dimetylsulfoksid |
| ECL | Enhanced chemiluminescence |
| ERK | Ekstracellulær-signal-regulerende-kinase |
| ETK | Elektrontransportkjeden |
| FA | Fettsyrer |

| | |
|----------|----------------------------------------------------------|
| FAT/CD36 | Fettsyre-translokase protein |
| FABP | Fettsyrebindende protein |
| FCS | Føtalt kalveserum |
| FFA | Frie fettsyrer |
| FTP | Fettsyrettransportprotein |
| Glu | Glukose |
| G-6-P | Glukose-6-fosfat |
| GLUT | Glukosetransportør |
| HBSS | Hanks bufret saltløsning |
| HEPES | ”4-(2 hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid” |
| HFD | High fat diet/ Høyfettdiett |
| HRP | ” Horseradish-peroxidase” |
| HSL | Hormonsensitiv lipase |
| iE- DAP | γ-D-glutamyl- mesodiaminopimelinsyre |
| IκBα | NF-κB inhibitor |
| IKK | IκB kinase |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IMTG | Intramuskulært triacylglycerol |
| IR | Insulinresistens |
| IRS | Insulinreseptorsubstrat |
| JNK | c-Jun NH ₂ -terminal Kinase |
| KMI | Kroppsmasseindeks |

| | |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|
| KO | Knockout |
| LD | Levende donor |
| LPL | Lipoprotein lipase |
| LPS | Lipopolysakkarider |
| LRR | c-terminal- Leucine-rich repeats |
| MAG | Monoacylglycerol |
| MAPK | Mitogenaktivert protein kinase |
| MDP | Muramyl dipeptid, MurNAc-L-Ala-D-isoGln |
| mRNA | Messenger ribonukleinsyrer |
| NF-κB | Nuclear factor kappa-light -chain-enhancer of activated B cells |
| NLR | NOD-like reseptor |
| NOD | Nucleotide-binding oligomerization domain proteins |
| OA | Oljesyre |
| PAMP | Patogen associated molecular patterns |
| PBS | Fosfatbufret salin |
| PBS-T | Fosfatbufret saltvann med Tween-20 |
| PDH | Pyruvat dehydrogenase |
| PDK1 | 3-fosfoinositidavhengig kinase -1 |
| PGN | Peptidoglykan |
| PIP ₂ | Fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfat |
| PIP ₃ | Fosfatidylinositol (3,4,5)-trisfosfat |
| PKC | Proteinkinase C |

| | |
|---------------|--------------------------------------------------------|
| PRRs | Pattern recognition receptors |
| PYD | Pyrin domain |
| RIP2 | Receptor interacting protein kinase 2 |
| ROS | Reaktive oksygenspesies/ Reaktive oksygen forbindelser |
| SEM | Standardfeil (til gjennomsnitt) |
| SH2 | Src-homologi-2 |
| T2D | Type 2-diabetes |
| TAG | Triacylglycerol |
| TNF- α | Tumor nekrose faktor- α |
| VLDL | ”Very low density” lipoprotein |

Innholdsfortegnelse

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. Innledning | 1 |
| 1.1 Skjelettmuskel - oppbygging og struktur | 1 |
| 1.2 Energimetabolisme i skjelettmuskelceller | 2 |
| 1.2.1 Fettsyremetabolisme | 2 |
| 1.2.2 Glukosemetabolisme | 3 |
| 1.3 Effekter av 5'AMP-aktivert proteinkinase (AMPK) i skjelettmuskel | 5 |
| 1.4 Insulin | 5 |
| 1.4.1 Insulins rolle i regulering av energimetabolisme | 5 |
| 1.4.2 Insulinsignalveien - effekt på glukosehomeostase i skjelettmuskel | 6 |
| 1.5 Insulinresistens i skjelettmuskelceller | 8 |
| 1.6 Fedme og type 2-diabetes - | 11 |
| en lavere grad av systemisk inflammasjon | 11 |
| 1.7 Tarmmikrobiota, fedme og type 2-diabetes | 13 |
| 1.7.1 Tarmmikrobiota og energimetabolisme | 15 |
| 1.7.2 Mekanismer bak mikrobiota-indusert fedme og T2D | 15 |
| 1.8 Mønsterkjenningsreseptorer (PRRS) | 17 |
| 1.8.1 NLRs | 18 |
| 1.8.2 NOD1 | 19 |
| 1.8.3 NOD2 | 19 |
| 1.8.4 Signaleringsmekanismer ved NOD1-/ NOD2-aktivering | 20 |
| 1.8.5 Metabolske effekter av NOD1/NOD2 | 22 |
| 1.9 Formål med oppgaven | 23 |
| 2. Materialer og metoder | 24 |
| 2.1 Materialer | 24 |
| 2.1.1 Kjemikalier og reagenser | 24 |
| 2.1.2 Utstyr | 26 |
| 2.2 Celler | 27 |
| 2.3 Cellebankopprettelse | 28 |
| 2.3.1 Oppskalering | 28 |
| 2.3.2 Nedfrysning av celler | 28 |
| 2.3.3 Telling av celler | 29 |
| 2.4 Celledyrking | 29 |
| 2.4.1 Utsåing | 29 |
| 2.4.2 Proliferasjon og differensiering | 30 |
| 2.4.3 Behandling av myotuber | 31 |
| 2.5 Substratoksidasjonsmetoden | 32 |
| 2.5.1 Utførelse av CO ₂ -trapping | 32 |
| 2.5.2 Celleassosiert radioaktivitet | 34 |
| 2.5.3 Bradfords metode for proteinmåling | 35 |
| 2.6 Western blotting | 36 |
| 2.6.1 Høsting av celler | 37 |
| 2.6.2 Proteinmåling | 38 |
| 2.6.3 Gelelektroforese | 38 |
| 2.6.4 Blotting | 38 |
| 2.6.5 Blokkering og inkubering med antistoff | 39 |
| 2.6.6 Deteksjon og kvantifisering | 39 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7 Statistikk | 40 |
| 3.Resultater | 41 |
| 3.1 Påvisning av mRNA-ekspressjon av NOD1-/NOD2-reseptorer i humane skjelettmuskelceller | 41 |
| 3.2 Effekter av NOD1/2-ligand på energimetabolisme..... | 42 |
| 3.3 Effekter av NOD1-ligand på energimetabolisme | 44 |
| 3.3.1 Oljesyremetabolisme..... | 44 |
| 3.3.2 Glukosemetabolisme | 48 |
| 3.4 Effekter av NOD2-ligand på energimetabolisme | 52 |
| 3.4.1 Oljesyremetabolisme..... | 52 |
| 3.4.2 Glukosemetabolisme | 55 |
| 3.5 Effekt av fettsyrer sammen med spesifikke NOD-ligander på glukosemetabolisme | 58 |
| 3.5.1 Palmitinsyre sammen med NOD1-ligand på glukosemetabolisme | 58 |
| 3.5.2 Palmitinsyre sammen med NOD2-ligand på glukosemetabolisme | 60 |
| 3.6 Effekt av hyperglykemi sammen med spesifikke NOD-ligander på glukosemetabolisme | 61 |
| 3.6.1 Hyperglykemi sammen med NOD1-ligand på glukosemetabolisme | 61 |
| 3.6.2 Hyperglykemi sammen med NOD2-ligand på glukosemetabolisme | 63 |
| 3.7 Effekter av NOD-ligander på insulinsignalerings | 65 |
| 4.Diskusjon | 67 |
| 4.1 Satellittceller til human myotuber <i>in vitro</i> , modell for human skjelettmuskel <i>in vivo</i> | 67 |
| 4.2 mRNA-ekspressjon av NOD1 og NOD2 i humane myotuber..... | 68 |
| 4.3 Effekter av NOD-ligander på glukose- og oljesyremetabolisme i humane myotuber | 69 |
| 4.4 Effekter av NOD-ligander på insulinstimulert glukosemetabolisme og Akt-fosorylering..... | 73 |
| 4.5 Mulige mekanismer bak effekter av NOD-ligander | 75 |
| 4.6 Veien videre..... | 76 |
| 5.Konklusjon | 77 |
| Litteraturliste..... | 78 |
| Vedlegg / Appendiks..... | 84 |

1. Innledning

1.1 Skjelettmuskel - oppbygging og struktur

Skjelettmuskulatur utgjør rundt 45% av kroppsvekten hos en voksen person og er et viktig organ i energiomsetningen av glukose og fettsyrer. Skjelettmuskulaturen består av rundt 600 separate muskler. Hver muskel består av muskelceller, bindevev, blodårer og nerver. Skjelettmuskelceller dannes under fosterutviklingen ved at embryonale celler (myoblaster) fusjonerer til flerkjernede muskelceller (myotuber). Etter fødsel er nydanning av muskelceller svært liten. Ved økende vekst vil derfor skjelettmuskelens volum øke ved å øke størrelsen på hvert enkelt muskelfiber. Ferdig utvikste muskelfibre har en diameter på 0,01-0,1mm og en lengde opptil 30 centimeter [1].

Muskelfibrene i muskler er oppbygd av myofibriller, sylindriske strukturer på 1-2 μm , og utgjør ca. 80 % av muskelfibrenes masse. Myofibriller består av mange sarkomerer. I hver sarkomer danner aktin (tynn) og myosin (tykk) myofilamenter i et ordnet mønster, og mønsteret vil gjenta seg langs en myofibrill. I alle parallelle muskelfibriller ligger sarkomerene i linje, og det er dette som gir skjelettmuskulaturen det tverrstripete utseende [1].

Under muskelkontraksjon forskyves aktin- og myosinfilamentene seg i forhold til hverandre, og sarkomeren blir forkortet. Det skjer en økt overlapping mellom aktin- og myosinfilamentene. Myosinhodene binder seg til aktin og bøyer seg mot midten av myosinfilamentene før de slipper taket og retter seg opp igjen. Prosessen gjentar seg hver gang energi overføres til myosinhodene ved adenosintrifosfat(ATP)-spaltingen. ATP hydrolyseres til adenosindifosfat (ADP) og fosfat, og det frigjøres energi. Kalsium(Ca^{2+})-konsentrasjonen inne i muskelcellen skal være høy for at myosinhodene skal binde seg til aktin. Kontraksjonen til skjelettmuskelcellene er viljestyrt og reguleres av det somatiske motoriske nervesystemet som følge av aksjonspotensialer og frigjøring av Ca^{2+} fra sarkoplasmatiske retikulum [1].

1.2 Energimetabolisme i skjelettmuskelceller

1.2.1 Fettsyremetabolisme

Triacylglycerol (TAG) er det dominerende lipidet i maten og blir spaltet av spesifikke lipaser til tre fettsyrer og et glyserolmolekyl i tarmen. I tarmen danner fettsyrer miceller som tas opp av tarmceller. Videre i tarmceller reesterifiseres fettsyrer til TAG og blir pakket sammen med proteiner og fosfolipider til kylomikroner. Kylomikroner entrer lymfesystemet og kommer derfra direkte ut i det systemisk kretsløpet [1]. Ved hjelp av lipoproteinlipaser i endotelceller langs kapillærårene i fettvev, lever, hjerte og skjelettmuskulatur spaltes frie fettsyrer av. I fettvev reesterifiseres fettsyrer og lagres som TAG [2]. Plasmanivåer av frie fettsyrer (FFA) relateres til lipolyse i hele kroppen, hovedsakelig fra fettvev og en mindre del fra muskler [3].

Skjelettmuskulatur bruker fettsyrer (FA) som dominerende energikilde under fasting, og muskel er hovedstedet for fettsyreoksidasjon både ved hvile og trening. Under lavintensiv trening er det vist at 65% av oksygenforbruket var i forbindelse med oksidasjon av lipider [4]. I skjelettmuskulaturen lagres FA i overskudd i form av intramuskulært triacylglycerol (IMTG). IMTG er et energirikt depot og inneholder mer enn 50% mer energi enn lagret muskelglykogen. Adipose triacylglycerid lipase (ATGL) og hormonsensitiv lipase (HSL) spiller en viktig rolle i hydrolysen av IMTG. ATGL og HSL hydrolyseres IMTG til diacylglycerol (DAG), monoacylglycerol (MAG) og frigjør FA og glyserol [5].

FA ligger i to hovedformer i blodet enten bundet til albumin eller i form av very low density lipoprotein (VLDL). Både opptak og oksidasjon av FA er regulert av flere trinn i skjelettmuskelceller og er ikke en like raskt tilgjengelig energikilde som karbohydrater [5]. Det er tre viktige intramuskulære mekanismer involvert i regulering av fettsyremetabolisme. Det er transport av FA inn i muskelen, IMTG-lipolyse under influens av hormonsensitiv lipase (HSL) og adipose triacylglycerid lipase (ATGL) [4, 5] og transport av FA inn i mitokondrier [4].

Lipoprotein lipase (LPL) dissosierer FA fra albumin og VLDL som transporteres via endotel i årene over i vevsvæske. Ved hjelp av fettsyretransportører blir FA tatt opp i cellene. Det er identifisert flere fettsyretransportører hvor fettsyrebindende protein (FABP), fettsyretranslokase protein (FAT/CD36) og fettsyre transportprotein (FTP) er tre viktige

fettsyretransportører. FA binder til plasmamembranassosiert fettsyrebindende protein (FABPpm) og translokeres over i cytosol ved hjelp av FAT/ CD36. I cytosol blir FA transportert intracellulært av FABP før de blir omdannet til acyl-CoA av acyl-CoA syntase (ACS). ACS ligger i den ytre membranen i mitokondriene. Karnitin palmitoyltransferase-I (CPTI) medierer transporten av acyl-CoA inn i mitokondrier ved å omdanne acyl-CoA til acyl-CoA-karnitin før det transporteres inn i mitokondriene. FA-transport i mitokondrier av CPT1 er et viktig trinn i regulering av fettsyremetabolisme, og CPT1 er et hastighetsbestemmende enzym for fettsyreoksidasjon. I mitokondrier omdannes acyl-karnitin igjen til acyl-CoA av karnitin palmitoyltransferase-II (CPTII). Videre blir acyl-CoA oksidert av β -hydoksyacyl-CoA dehydrogenase (β -HAD) til acetyl-koenzym A (acetyl-CoA) som videre blir oksidert i sitronsyresyklus og oksidativfosforylering og avgir energi (ATP) og H_2O [2, 4, 5].

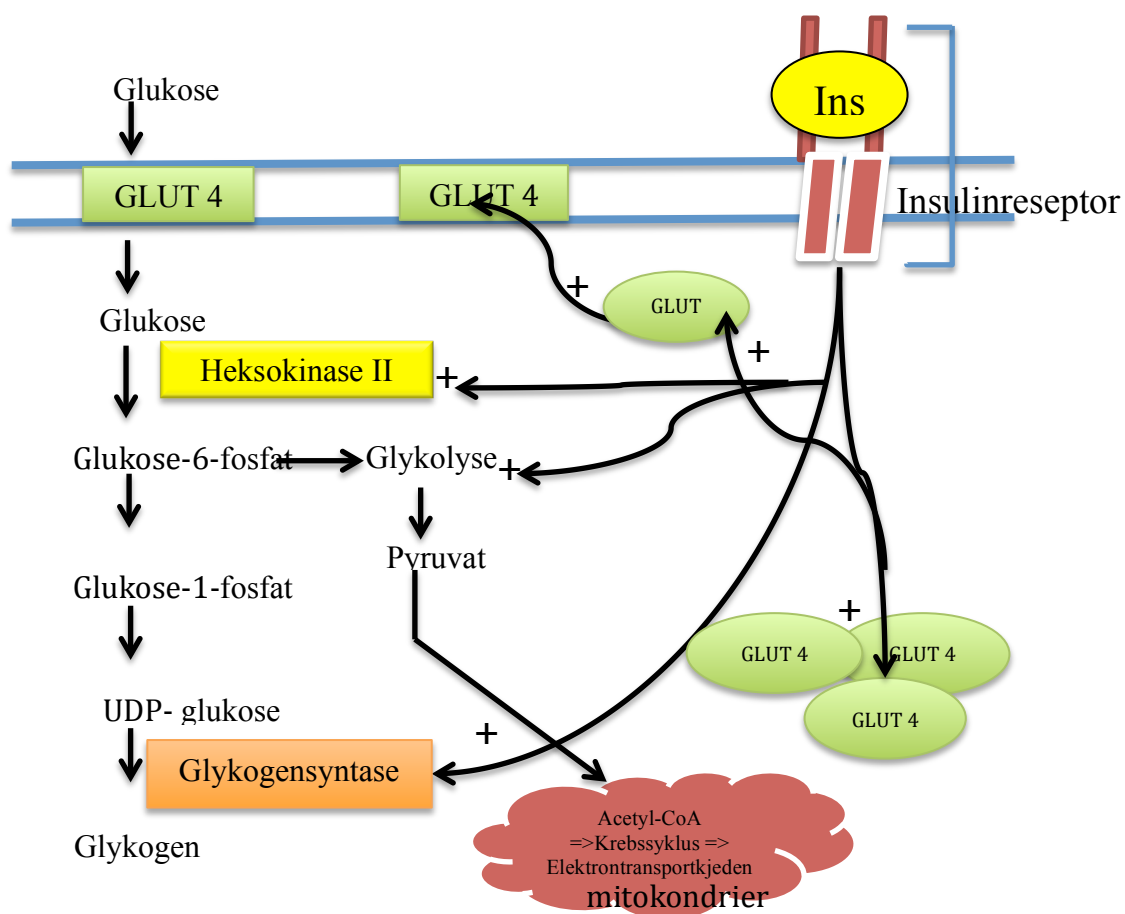
1.2.2 Glukosemetabolisme

Skjelettmuskel er det viktigste vevet i kroppen til å regulere blodglukose som følge av insulinstimulering etter et måltid og under fysisk aktivitet. Glukose er et viktig metabolsk substrat i alle humane celler til å utvinne energi [6, 7] og transporteres inn i celler via passiv diffusjon via en familie av såkalt glukosetransportører (GLUTer) [8]. Glukosetransportører har en viktig rolle i regulering av glukose-homeostase og uttrykkes organspesifikt [6]. Stuart, Yin et al. fant sju glukosetransportører uttrykt i normalvektig human muskelbiopsi GLUT1, GLUT3, GLUT4, GLUT5, GLUT8, GLUT11 og GLUT12, hvor GLUT4, GLUT5 og GLUT 12 var de dominante [9]. GLUT4 er den glukosetransportøren som står ansvarlig for insulinstimulert glukoseopptak [8, 9], mens GLUT1 er ansvarlig for glukoseopptak under basale forhold (faste, hvile) [10, 11]. Under basale forhold ligger GLUT4 intracellulært [6], mens GLUT1 primært er lokalisert i plasmamembranen [11].

Insulin transporterer GLUT4 fra intracellulært over til plasmamembranen for å mediere glukoseopptak i skjelettmuskel [12]. Glukosetransport over cellemembranen er hastighetsbestemmende for glukosemetabolisme i muskel [6]. Etter at glukose er tatt opp i muskler ved hjelp av GLUT4, blir det fosforylert av heksokinase II og raskt omdannet til glukose-6-fosfat (G6P). Videre omdannes G6P til og lagres som glykogen eller inngår i glykolysen for videre oksidasjon til pyruvat og ATP-produksjon. Omtrent 90% av glukosen blir oksidert og resten 10 % blir omdannet til laktat [11]. Pyruvat omdannes deretter til

acetyl-CoA og inngår i sitronsyresyklus i mitokondriene og via oksidativ fosforylering ved elektrontransportkjeden blir energi utvunnet sammen med CO_2 og vann [13] (Fig.1.1).

Pyruvatdehydrogenase er et hastighetsbestemmende enzym i glukoseoksidasjon som omdanner pyruvat til acetyl-CoA i mitokondrier. I følge Randle, Garland et al. teori vil økt fettsyrekonsentrasjon øke fettsyreoksidasjon og hemme glukoseoksidasjon. Økt acetyl-CoA og citrat som følge av økt fettsyreoksidasjon hemmer pyruvatdehydrogenase (PDH) og fosfofruktokinase (PFK) og reduserer glykolysehastigheten. Akkumulering av G6P hemmer videre heksokinase II via feedback-mekanisme og reduserer glukoseopptak [4, 14].



Figur1.1: Forenklet oversikt over metabolske veier for glukose i skjelettmuskelceller: Insulinbinding til en insulinreseptor fører til translokasjon av GLUT4-transportører ompakket i vesikler over til cellemembranen og transporterer glukose inn i muskelcellene. Glukose omdannes av heksokinase II til glukse-6-fosfat. Glukose-6-fosfat går videre enten i glykolyse => pyruvat => acetyl-CoA => krebsyklus => elektrontransportkjeden og utvinner energi sammen med CO_2 og H_2O eller omdannes til glukose-1-fosfat =>UDP-glukose og lagres som glykogen. Insulin stimulerer heksokinase II, glykogensyntase og glykolyse. Figuren er modifisert fra [15].

1.3 Effekter av 5'AMP-aktivert proteinkinase (AMPK) i skjelettmuskel

AMP-aktivert proteinkinase (AMPK) utgjør en viktig rolle i å opprettholde energihomeostase i cellen. AMPK er et energisensorenzym og aktiveres ved økt energibehov dvs. ved økt intracellulært AMP-nivå (økt cellulær AMP/ADP:ATP forhold). Ved aktivering av AMPK oppreguleres katabolske prosesser som fører videre til ATP-produksjon, og nedregulerer anabolske og andre prosesser som forbruker ATP [16]. I skjelettmuskler vil aktivert AMPK øke fosforylering av Akt-substrat 160kD (AS160) og rekruttering av glukosetransportør GLUT4 til plasmamembranen for glukoseopptak [17, 18]. I tillegg vil aktivert AMPK rekruttere fettsyretransportør CD36, til plasmamembranen for fettsyreopptak. AMPK stimulerer fettsyreoksidasjon ved fosforylering og inaktivering av hastighetsbestemmende enzym, acetyl-CoA karboksylase (ACC) i fettsyresyntese [19]. ACC omdanner det primære substratet acetyl-CoA til malonyl-koenzym A (malonyl-CoA), første intermediat i dannelsen av langkjedede fettsyrer [2, 20]. Inaktivering av ACC reduserer nivået av malonyl-CoA som er begrensende for fettsyreoksidasjon og er en regulator for CPTI aktivitet [2, 16]. I tillegg reduserer AMPK glykogensyntesen i skjelettmuskel via fosforylering og inaktivering av glykogensyntase-1. Aktivert AMPK medierer fosforylering av flere transkripsjonsfaktorer som er sentrale i regulering av gener involvert i mitokondriell biogenese og beskyttelse mot oksidativt stress [16].

1.4 Insulin

1.4.1 Insulins rolle i regulering av energimetabolisme

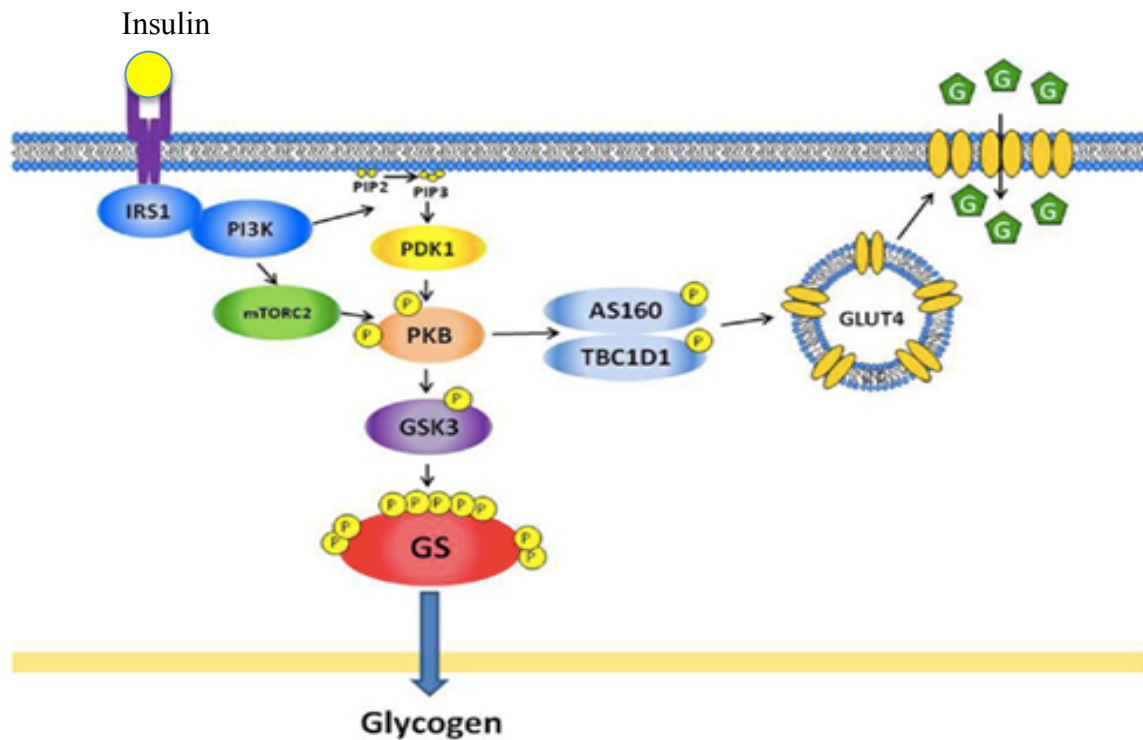
Insulin er et hormon som produseres i bukspyttkjertelen og frigjøres som respons på et karbohydratrik måltid [1]. Hovedfunksjonen til insulin er å stabilisere glukosekonsentrasjon i blodet etter et måltid ved å øke glukoseopptak i skjelettmuskulatur og fettvev, og samtidig hemme glukoseproduksjon og stimulere glykogensyntese i lever. Dessuten er insulin et anabolsk hormon som i tillegg til glukose, øker opptak av aminosyrer og fettsyrer, bygger energilagre i fettvev, lever og skjelettmuskulatur, stimulerer lipogenese, glykogensyntese og proteinsyntese og hemmer nedbrytning og frigjøring av disse til blodet [12]. Insulin hemmer aktivering av hormonsensitiv lipase (HSL) og gir dermed antilipolytisk effekt [2, 12].

1.4.2 Insulinsignalveien - effekt på glukosehomeostase i skjelettmuskel

Insulin utøver sin effekt ved å binde seg til en insulinreseptor som tilhører reseptor tyrosinkinase-familien. Insulinreseptor er et tetramerisk protein med to ekstracellulære α -subenheter og to transmembranale β -subenheter. α -subenheten virker som et allosterisk enzym ved å hemme tyrosinkinaseaktiviteten til reseptorens β -subenhet. Når insulin binder til α -subenheten fører det til konformasjonsendring i reseptoren og stimulerer tyrosinkinaseaktiviteten på den intracellulære β -subenheten [12, 21]. Dette setter i gang transfosforylering flere steder på tyrosin-enheter og er første ledd i insulinreseptor-aktivering [21]. Insulinreseptor fosforylerer videre intracellulære proteiner blant annet tyrosinfosforylering av insulinreseptorsubstrat-1 (IRS-1). Det dannes IRS-1-kompleks ved at protein med Src homology 2 (SH2)-domener bindes. IRS-1-komplekset interagerer videre med nedstrøms intracellulære signalproteiner og en kaskade av intracellulære signalveier aktiveres som RAS \Rightarrow mitogen-aktiverte protein kinaser (MAPKs) og fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K). Aktivering av PI3K er hovedansvarlig for insulin-effekter på glukose-, lipid og proteinmetabolisme. PI3K fosforylerer fosfatidylinositol 4,5 bisfosfat (PIP₂) og katalyserer dannelsen av såkalt "second messenger" fosfatidylinositol 3,4,5 trifosfat (PIP₃) som videre aktiverer 3-fosfoinositidavhengig kinase-1 (PDK1) [12]. PDK1 fosforylerer protein kinase B (Akt) på treonin³⁰⁸ (Tre³⁰⁸). I tillegg kreves det en fosforylering av serin⁴⁷³ (Ser⁴⁷³) av "mammalian target of rapamycin complexed with Rictor" (mTORC2) for å oppnå maksimal aktivering av Akt [22, 23] (Fig.1.2). Akt er et viktig protein i aktivering av proteiner som spiller en viktig rolle i insulinmedierte metabolske effekter [21]. Akt i fosforylert tilstand medierer en fosforylering og inaktivering av AS160 og TBC1D1 [22, 24]. Dette fører til en translokasjon av glukosetransportør GLUT4 pakket i intracellulære vesikler over til cellemembranen for å øke glukoseopptak og stabilisere glukosekonsentrasjon i blodet [24] (Fig.1.2). Akt er en serin/treoninkinase og kan fosforylere PKA/GSK-3 (protein kinase A/ glykogen syntase kinase-3) slik at GSK-3 inaktiveres. Glykogensyntase (GS) hemmes av GSK-3 [21, 25]. Dette fører til at GS aktiveres og stimulerer glykogensyntese. GS katalyserer omdannelsen av UDP-glukose til glykogen, i siste trinnet i glykogensyntesen [25].

I tillegg til fosforylering av tyrosingrupper kan insulinreseptor og IRS-proteiner bli fosforylert ved serin/ treoningrupper, noe som fører til at selve insulinsignalet blir svekket og PI3K, Akt, GSK-3 er blant kinasene som da blir hemmet. Dette kan bidra til insulinresistens

(IR). Dessuten blir insulinreseptor og deres substrater rask defosforylert av tyrosin fosfataser, og insulinsignaleren blir hemmet/svekket. Det er kjent fire intracellulære IRS-proteiner hvor rollene til IRS-3 og IRS-4 i dyrkede celler ikke er helt klare, men noen data støtter at disse virker som negativ regulator for IRS-1 og IRS-2 [12].



Figur1.2: Forenklet oversikt over insulinsignalveien i regulering av glukose transport i skjelettmuskelceller: Insulinbinding til insulinreseptor fører til konformasjonsendring og aktivering av reseptoren etterfulgt av autofosforylering av tyrosingrupper på den intracellulære β -subenheten. Insulinreseptor tyrosinfosforylerer insulinreseptorsubstrat-1 (IRS-1) som videre aktiverer fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K). En kaskade av nedstrøms intracellulære signalproteiner blir aktivert. PI3K katalyserer dannelsen av fosfatidylinositol 3,4,5 trifosfat (PIP_3) og aktiverer mammalian target of rapamycin complexed with Rictor (mTORC2). Protein kinase B (PKB, også kalles Akt) blir fosforylert og aktivert av to oppstrøms kinaser, 3-fosfoinositidavhengig kinase-1 (PDK1) og mammalian target of rapamycin complexed with Rictor (mTORC2) før den fosforylerer og inaktiverer Akt substrat 160 kDa (AS160) og TBC1D1. Inaktivering av AS160 og TBC1D1 fører til translokasjon av GLUT4-transportør fra intracellulært over til cellemembranen for å mediere glukoseopptak i muskelcellene. Inaktivering av glykogen syntase kinase-3 (GSK3) via fosforylering av PKB aktiverer glykogensyntase (GS) som stimulerer videre glykogensyntese. Figuren er hentet og modifisert fra [22].

1.5 Insulinresistens i skjelettmuskelceller

Insulinresistens (IR) betyr nedsatt insulinfølsomhet, hvor kroppen lager insulin, men har manglende biologisk insulinrespons i målorganer som skjelettmuskel, fettvev og lever. Ved insulinresistens er insulinstimulerte prosesser redusert (se avsnitt 1.4.1). Dette vil føre til redusert glukosetransport i muskler og fettvev. Resultatet blir økt blodsukker samtidig økes plasmanivåer av FFA på grunn av redusert antilipolytisk effekt av insulin [11]. Bukspyttkjertelen vil prøve å kompensere for dette ved å øke insulinmengden i blodet såkalt hyperinsulinemi. Blodsukkeret vil fortsatt stige i og med at insulin virker for dårlig og vil til slutt "trette ut" bukspyttkjertelen, og man er i ferd med å utvikle type 2-diabetes (T2D) [26].

Det er flere mulige underliggende mekanismer som kan forklare utvikling av IR i skjelettmuskelceller. Det er blant annet intracellulær akkumulering av lipiderivater [11], inflammasjon, cytokiner, bakterieprodukter som lipopolysakkarid (LPS), deler av peptidoglykanlag som muramyldipeptid (MDP) [27] og dipeptid γ -D-glutamyl-mesodiaminopimelinsyre (iE-DAP) [28], mitokondriedysfunksjon og mitokondriestress [24, 29, 30] (Fig.1.3).

Høye plasmanivåer av frie fettsyrer ved en overvektig og inaktiv tilstand øker det muskulære opptaket av ikke-forestrede fettsyrer uten etterfølgende økning i β -oksidasjon [31]. Dette fører til intramyocellulær akkumulering av FFA i form av IMTG, ceramider [5], lipiderivater som diacylglycerol (DAG) og langkjedede acyl-CoA [24, 32]. Diacylglycerol er en aktivator av protein kinase C (PKC), en serinkinase, induserer serin 307 fosforylering av IRS-1, og reduserer tyrosinfosforylering av IRS-1 som videre hemmer aktivering av insulinsignalveien [5, 24, 32]. Ceramider reduserer både fosforylering av Akt/PKB ved å øke aktiviteten av proteinfosfataser og hemmer translokasjon av Akt/PKB til plasmamembranen hvor fosforylering skjer [5, 33]. Dette resulterer i perifert IR i muskelceller [24, 32]. PKC- θ , inhibitor kappa kinase β (IKK β), c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) og p38 mitogen aktivert protein (MAP) kinaser er blant kinaser som blir aktivert av mettede fettsyrer. Disse kinasene antas å katalysere fosforylering av serin/treonin enheter på IRS-1 og redusere tyrosinfosforylering av IRS-1 og hemme aktivering av insulinsignalveien [24] (Fig.1.3). I tillegg promoterer også disse kinasene inflammatorisk genekspressjon via aktivering av aktivator protein(AP)-1 og nukleær faktor kappa-lettkjede-enhancer av aktiverte B-celler (NF- κ B) [34]. Blant mettede langkjedede fettsyrer er palmitinsyre (PA) og stearinsyre potente

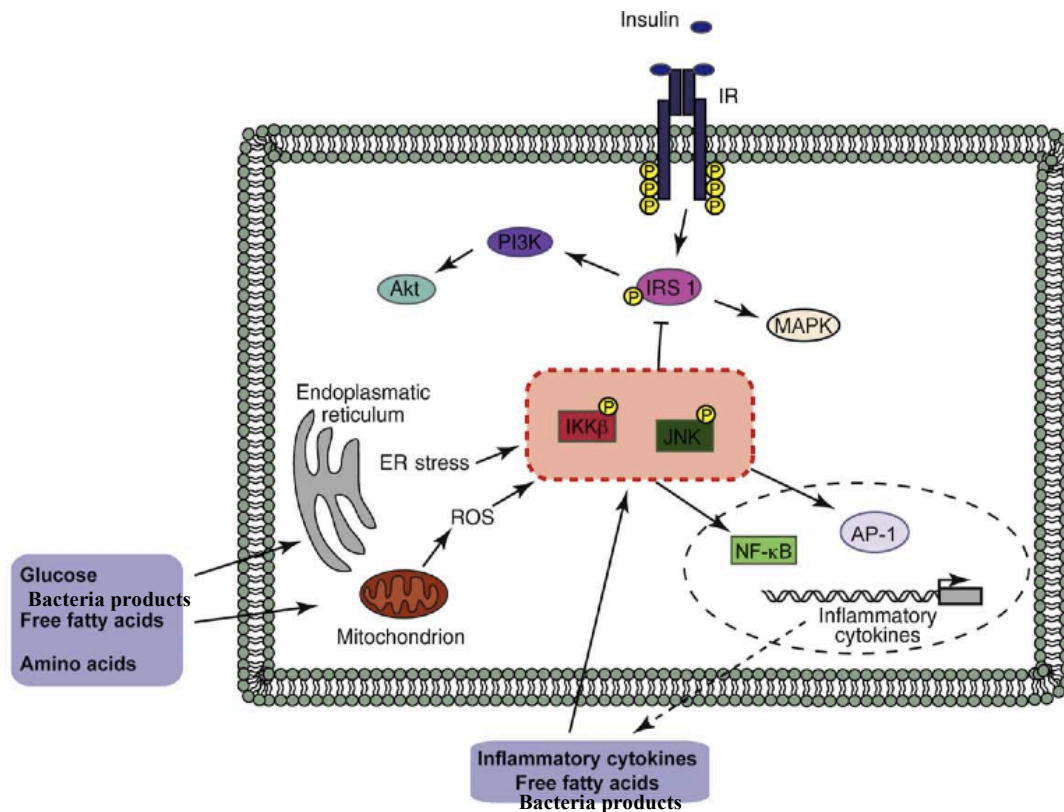
indusere av IR [24]. PA er både en PKC- θ aktivator, samt aktiverer NF- κ B inflammatorisk vei og induserer økt uttrykt av pro-inflammatoriske cytokiner som interleukin-6 (IL-6) og tumornekrosefaktor- α (TNF- α) i skjelettmuskelceller [17] (Fig.1.3). AMPK-aktivering reduserer ceramidsyntese og fettsyreindusert NF- κ B-aktivering involvert i utvikling av IR [35].

Cytokiner som TNF- α og IL-6 er blant hovedinflammasjonsmediatorer som er økt både i sirkulasjonen og i skjelettmuskelceller ved fedme og T2D [35-37]. TNF- α er involvert i utvikling av IR i skjelettmuskelceller, men mekanismen ikke er helt klar. TNF- α er demonstrert å redusere AMPK-aktivitet ved å oppregulere protein fosfatase 2C (PP2C). PP2C defosforilerer AMPK som reduserer videre fosforilering av ACC og undertrykker fettsyre β -oksidasjon. Akkumulering av lipider (ceramider, DAG) trigger en kaskade av kinaser som PKC, IKK β og JNK. Disse kinaser hemmer insulinsignaler ved serin/treonin fosforilerer IRS-1 og hemmer videre glukose transport i skjelettmuskelceller [37, 38].

Tarmbakterier og bakterieprodukter fra tarm som kommer over i systemisk kretsløpet antas også å spille en rolle i utvikling av lavgradig inflammasjon og IR. Lipopolysakkarid (LPS) er en del av ytre cellevegg til gram-negative bakterier og er moderat økt i systemisk kretsløp både ved fedme og T2D. LPS og peptidoglykanderivater aktiverer det medfødte immunsystemet via aktivering av Toll-lignende reseptorer (TLRs) og NOD-lignende reseptorer (NLRs) (se avsnitt 1.8) og øker frigjøring av pro-inflammatoriske cytokiner og kjemokiner. Pro-inflammatoriske cytokiner og kjemokiner øker videre rekruttering og aktivering av immunceller (nøytrofiler, monocytter, makrofager). Det initierer inflammasjon i energimetabolismeorganer som fettvev, lever og skjelettmuskulatur og påvirker insulinfølsomheten og fører til IR [39, 40] (Fig.1.4).

Mitokondriedysfunksjon og oksidativt stress i mitokondrier er andre mulige årsaker tilknyttet utvikling av IR i muskelceller [11, 24]. Hypotesen er at økt opptak av mettede fettsyrer i muskelceller undertrykker gentranskripsjon relatert til mitokondriebiogenese og reduserer mitokondrienes oksidative kapasitet. Dette bidrar til økt produksjon av reaktive oksygen forbindelser (ROS) [24]. Maurya, Arha et al. demonstrerte nylig at syntetiske peptidoglykanderivater fra bakterier, muramyldipeptid (MDP), økte ROS i L6 rottemuskelceller [29]. Redusert mitokondriebiogenese og -funksjon resulterer i økt intramuskulært akkumulering av lipidderivater (DAG, ceramider) og ROS produksjon [24].

Lipidderivater, glukose og ROS aktiverer kinaser IKK β , p38 MAP, JNK, isoformer av protein kinase C (PKC- ζ og - ϵ) i skjelettmuskelceller som videre kan forstyrre insulinresponsen ved å indusere serin/treonin-fosforylering av IRS-1 og hemmer glukosetransport [24, 41](Fig.1.3). Det er studier hvor ROS reduserer GLUT4 gentranskripsjon [41].



Figur1.3: Mulige mekanismer bak inflammasjon og utvikling av IR: Insulin binder seg til insulinreseptor. Aktivisering av insulinreseptorsubstrat-1 (IRS-1) via tyrosinfosforylering aktiverer videre en kaskade av intracellulære signalveier (fosfoinositid-3-kinase (PI3K), mitogenaktivert kinase (MAPK)). Aktivisering av PI3K er hovedansvarlig for insulineffekter på glukose-, lipid- og proteinmetabolisme. Inflammasjonsveier kan aktiveres av ekstracellulære bakterieprodukter, pro-inflammatoriske cytokiner (tumornekrosefaktor- α (TNF- α), mettede fettsyrer og økt produksjon av reaktive oksygensubstanser (ROS) i mitokondrier. c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), Ikappa β kinase (IKK β), protein kinase C (PKC) er såkalt inflammatoriske kinaser aktiveres av lipidderivater, mettede fettsyrer, inflammatoriske cytokiner. Disse kinasene hemmer insulinsignaler ved serin/treonin fosforylerer IRS-1 og hemmer videre glukose transport i skjelettmuskelceller og fettvev. I tillegg promoterer disse kinasene aktivisering av inflammatoriske veier og øker transkripsjon av proinflammatoriske cytokiner via aktivisering av aktivatorprotein-1 (AP-1) og nukleær faktor kappa B (NF- κ B). Akkumulering av fettsyrer, hyperglykemi, bakterieprodukter kan indusere mitokondrie oksidativ stress => øker ROS => ROS ødelegger videre celledstrukturer og initierer inflammasjon. Figuren er modifisert fra [34].

1.6 Fedme og type 2-diabetes – en lavere grad av systemisk inflammasjon

Type 2-diabetes (T2D) er en kronisk endokrin sykdom med nedsatt insulinfølsomhet og relativ nedsatt insulinproduksjon forårsaket av β -celle dysfunksjon og apoptose [42-45] .

Prevalensen av T2D øker stadig på verdensbasis [46]. T2D opptrer helst i den voksne befolkningen, men diagnostieres stadig oftere også hos unge og barn. I år 2014 ble det estimert at 9 % over 18 år hadde diabetes i verden, hvorav 90% av dem hadde T2D [47]. Sykdommen utvikler seg gradvis over tid og er sterkt relatert til den moderne livsstilen med overernæring, høyt inntak av fettrik diett, stillesittende livsstil, fysisk inaktivitet i tillegg til arvelige faktorer [43, 48, 49]. Dette resulterer i økt forekomst av overvekt og fedme som er hovedårsaken til utvikling av T2D [31].

Fedme karakteriseres ved en mengde metabolsk forstyrrelser som er knyttet til glukosehomeostase og i utvikling av kardiovaskulære sykdommer [50]. Fedme og T2D er ofte assosiert med en lavere grad av systemisk inflammasjon [42, 50]. Det antas at aktivering av immunsystemet, økt frigjøring av bioaktive metabolitter fra fettvev slik som frie fettsyrer, lipider, proinflammatoriske cytokiner, endring i tarmmikrobiota og økt systemisk innhold av LPS og bakterieprodukter fra tarmen øker progresjon av sykdommen [42, 49, 51] (Fig.1.4). Fedme spesielt abdominalfedme er sterk assosiert til IR. Ved fedme og hos personer med T2D, er lipolyse økt på grunn av at fettvevet er resistent til insulineffekten. Abdominalfedme har høy lipolytisk aktivitet og vil være hovedansvarlig for høye plasmanivåer av fri fettsyrer (FFA) og hovedårsaken bak utvikling av IR [3, 31].

Ved fedme induseres inflammasjon i fettvevet og som respons vil fettvevet, et endokrint organ, skille ut bioaktive molekyler, cytokiner bl.a. $\text{TNF-}\alpha$ og kjemokiner. Dette vil rekruttere monocytter fra systemisk kretsløp over i fettvevet og øker videre infiltrasjon av makrofager som utskiller IL-6 og $\text{TNF-}\alpha$ som hoved-pro-inflammasjonsmediatorer. $\text{TNF-}\alpha$ øker lipolyse i fettvev ved fedme og øker plasmanivåer av fettsyrer. Fettsyrer fra adipocytter via lipolyse er vist å kunne virke som ligander til Toll lignende reseptorer (TLRs) (se avsnitt 1.8) og øker videre uttrykt av proinflammatoriske gener ($\text{TNF-}\alpha$) via aktivering av nukleær faktor kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) transkripsjonsfaktorer [36]. Det øker frigjøring av proinflammatoriske cytokiner som videre kan bidra til systemisk inflammasjon og IR [36, 42,

52]. Ved forhøyet plasmanivå av fettsyrer ved fedme, økes fettsyreopptak i skjelettmuskelceller og i lever og resulterer i triglyserid-, VLDL-, LDL- (low density lipoprotein) syntese i leveren. Når lagringskapasiteten overskrides, skjer ektopisk akkumulering av frie fettsyrer (FFA) i skjelettmuskelceller og lever, såkalt lipotoksitet [2, 24]. Akkumulering av FFA i perifere organer vil videre lede til lav grad inflammasjon og IR (Fig.1.4).

1.7 Tarmmikrobiota, fedme og type 2-diabetes

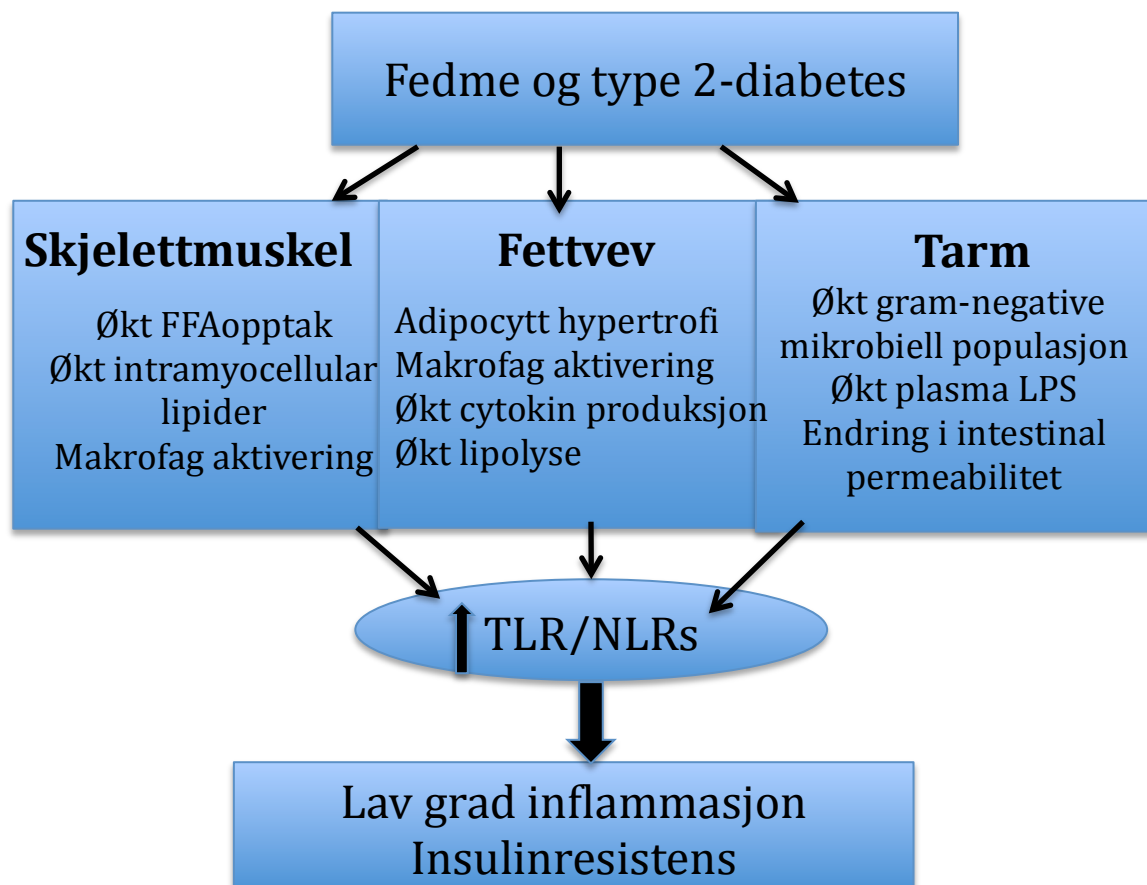
Tarmmikrobiota er den mest omfattende mikrobiota i kroppen som består av ca. 10^{14} bakterier fra over 1000 ulike arter [40, 53]. Dette betyr at det er cirka 10 ganger så mange bakterier i tarmen som egne celler i kroppen, og 100 ganger mer gener enn det humane genom [54, 55]. En sunn human tarmmikrobiota består av en kompleks organisering av ulike mikroorganismer og spiller en viktig rolle i regulering av metabolisme og inflammasjon [42]. Noen av de viktige funksjonene til tarmmikrobiota er blant annet å beskytte oss mot kolonisering av patogene inntrengere [50, 55], produsere antimikrobielle substanser [56], utvikle immunsystemet [50], styrke tarmens mikrovilli [50], øke proliferasjon og differensiering av tarmepitelceller for å opprettholde en intakt slimoverflate [56], fermentering og utvinning energi fra ufordøyelige karbohydrater [56], absorpsjon av elektrolytter og mineraler [54], nedbrytning av toksiske stoffer i maten [54], vitaminsyntese som folsyre og K-vitamin [54] og påvirke tarmpermeabiliteten [50].

Sammensetning av tarmflora er genetisk betinget, men forholdet mellom bakterietyper endres også som følge av ytre faktorer som blant annet type kosthold, stress, lokalisering, alder, bakterieinfeksjoner, fødselsvei, antibiotika behandling etc. [40, 42, 53, 54, 57].

Tarmmikrobiota er involvert i patogenese av T2D og fedme. Fedme og T2D er assosiert med endringer i sammensetning og metabolsk funksjon av tarmmikrobiota [53, 58] (Fig.1.4). Gram-negative *Bacteroidetes* og gram-positive *Firmicutes* er dominerende rekker og utgjør 90% av tarmmikrobiota [40, 59]. Det er gjort ulike metagenomiske studier hvor fordelingen av de dominerende rekkene *Bacteroidetes* og *Firmicutes* viste å være endret i tarmfloraen hos overvektige og T2D personer i forhold til normalvektige [42, 51]. Overvektige og pasienter med T2D har i tarmflora signifikante forskjeller i bakterier som *Bifidobacterium spp.* (*Actinobacteria*), *Lactobasillus spp.* og *Clostridium spp.* (*Firmicutes*) [42, 56].

Endring i sammensetning av tarmmikrobiota kan påvirke tarmpermeabilitet og øke tilstrømning av bakterieprodukter til blodbanen [40]. Høy inntak av fettrik diett endrer sammensetningen av tarmmikrobiota og medfører lav antall av *Bifidobacterium spp.* og økt nivå av LPS og bakterieprodukter i blodbanen [51, 60]. LPS har stor affinitet til kylomikroner ved høyfettdiett og er moderat økt i systemisk kretsløp både ved fedme og T2D [40, 54]. *Bifidobacterium spp.* senker nivå av LPS og bakterieprodukter som peptidoglykanlag fra

tarmen over til blodet [40, 53]. Lavt innhold av *Bifidobacterium spp.* som ses ved fedme og T2D, kan øke tarmpermeabiliteten både for LPS, gram-negative bakterier og bakterieprodukter over i blodet [51]. Dette tyder på at forstyrrelser i organiseringen av tarmmikrobiota, såkalt dysbiose, kan medvirke til utvikling av lav grad av inflammasjon, fedme og IR [42, 51] (Fig1.4).



Figur1.4: En forenklet oversikt over fedmemediert utvikling av en lavere grad av systemisk inflammasjon og IR: Ved fedme forstørres adipocytter i fettvev (adipocyt hypertrofi) => makrofagaktivering => økt pro-inflammatorisk cytokinproduksjon. Pro-inflammatoriske cytokiner som tumornekrosefaktor- α (TNF- α) øker pro-inflammatoriske signaleringskaskader i tillegg til hemming av insulinreseptorsignaleringsvei og fører til lav grad av inflammasjon og IR i fettvevet og skjelettmuskelceller. Lipolyse i fettvev på grunn av TNF- α og manglende antilipolytisk effekt av insulin ved fedme øker plasmanivåer av frie fettsyrer (FFA). FFA tas opp av skjelettmuskelceller => ektopisk akkumulering av intramyocellulære lipider og makrofagaktivering i skjelettmuskel. Fettsyrer, lipidderivater som diacylglycerol (DAG) og ceramider hemmer insulinreseptor signaleringsvei. Dessuten endres mikrobiotasammensetning og tarmpermeabilitet ved T2D/fedme og fører til økt blodtilstrømning av gram-negative bakterier og lipopolysakkarid (LPS). Mettede fettsyrer fra fettvev og skjelettmuskelceller, LPS og bakterieprodukter (deler fra peptidoglykanlag) fra tarmen over i systemisk kretsløpet aktiverer det medfødte immunsystemet via aktivering av Toll-lignende reseptorer (TLR) og NOD-lignende reseptorer (NLRs) => øker pro-inflammatoriske signaleringsveier særlig nukleær faktor kappalettkjede-enhancer av aktiverte B-celler (NF- κ B) (se avsnitt 1.8.4). Dette øker pro-inflammatoriske cytokiner og utvikler en lavere grad av systemisk inflammasjon og IR i skjelettmuskelceller og fettvev. Figuren er modifisert fra[42].

1.7.1 Tarmmikrobiota og energimetabolisme

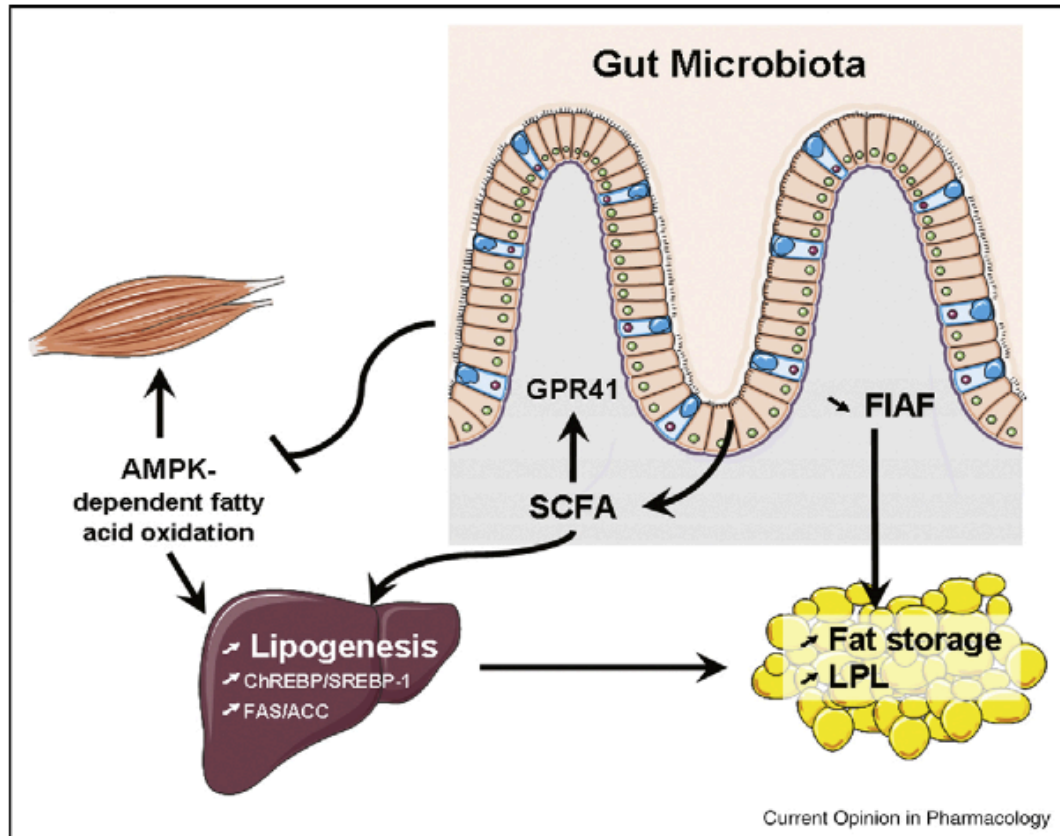
Det er gjort studier både på mus og mennesker for å forstå effekter av tarmmikrobiota på energimetabolisme og utvikling av fedme og T2D [40]. Backhed, Ding et al. fant i sin studie at sterile mus økte mengde kroppsfett med 60% og utviklet IR innen to uker ved kolonisering med tarmflora fra mus til tross for redusert matinntak [61]. I en annen studie ble det vist at sterile mus som fikk mikrobiota fra overvektige personer ble overvektige, mens mus som fikk mikrobiota fra tynne personer forble tynne [62]. Videre ble det vist at sterile mus var beskyttet mot høyfettdiett-indusert fedme, IR og dyslipidemia [63, 64]. Overvektige mus behandlet med antibiotika reduserte mengde fettvev og fettvevets inflammasjon og forbedret glukosemetabolisme [65, 66]. Dessuten er det vist overføring av tarmfloraen fra normalvektige øker insulinfølsomheten hos personer med metabolsk syndrom [67].

Disse studier tyder på at sammensetning av tarmflora kan påvirke energiopptak og spiller en viktig rolle i utvikling av inflammasjon og utvikling av fedme som er hovedårsak til utvikling av IR [54].

1.7.2 Mekanismer bak mikrobiota-indusert fedme og T2D

Flere hypoteser er foreslått for å forklare de underliggende mekanismer om hvordan sammensetning av mikrobiota i tarmen kan påvirke energiopptak og metabolisme og bidra til utvikling av fedme og fedmerelatert metabolske sykdommer, slik som T2D. Patologiske prosesser er fortsatt uklare, og det kreves flere studier (Fig.1.5).

Underliggende mekanismer som er foreslått er blant annet at tarmmikrobiota fremmer intestinal monosakkaridabsorpsjon ved å nedbryte ufordøyelige komplekse karbohydrater til oligosakkarider og monosakkarider (glukose) og ekstraherer energi i form av kortkjedede fettsyrer (SCFA) [40, 59]. Type og total produksjon av SCFA er avhengig av både sammensetning av tarmmikrobiota og karbohydratinntak som fermenteres. Endring i sammensetning og metabolsk funksjon av tarmmikrobiota ved fedme bidrar til at det ekstraheres mer energi (SCFA) fra mat [40, 58]. SCFA (acetat og propionat) går direkte via portvenen til leveren og er substrater til lipogenese og glukoneogenese [40](Fig.1.5). Økt plasmanivå av glukose med økt frigjøring av insulin som respons, er begge stimulatorer for å promotere lipogenese i leveren via ekspresjon av enzymer som acetyl-CoA karboksylase (ACC) og fettsyre syntase (FAS) [50].



Figur1.5: Mekanismer bak mikrobiota-indusert fedmeutvikling: Mikrobiota i tarmen utnytter energi fra mat og øker energilageret i kroppen. Energilageret økes ved å fremme intestinal monosakkaridabsorpsjon og øke dannelsen av kortkjedede fettsyrer (SCFA). Monosakkarider og SCFA promoterer videre lipogenese i lever via ekspresjon av acetyl-CoA karboksylase (ACC) og fettsyre syntase (FAS) som kontrolleres av karbohydrat responsiv element binding protein (ChREBP) og sterol responsiv element binding protein-1 (SREBP-1). I tillegg økes lipoprotein lipaseaktivitet (LPL) ved å undertrykke fasting induisert adipose faktor (FIAF) i tarm og øker frigjøring av fettsyrer og triacylglyseroler fra lipoproteiner i muskler og fettvev. Fettsyreoksidasjon i skjelettmuskelceller og lever kan reduseres ved at mikrobiota undertrykker AMP-aktivert protein kinase (AMPK). SCFA virker videre et signalmolekyl og binder seg til G-proteinkoblede reseptor-41 (GPR41) til regulering av genekspressjon involvert i energimetabolisme. Figuren er hentet fra [50].

TAG transporteres fra lever til fettvev via VLDL og TAG økes i fettvevet (Fig.1.5). Lipoprotein lipaseaktivitet økes ved å undertrykke faste-indusert adipose faktor (FIAF) i tarm og katalyserer frigjøring av fettsyrer og TAG fra sirkulerende lipoproteiner i muskler og fettvev. FIAF er en lipoprotein lipase-hemmer som finnes i lever, fettvev og tarm, men undertrykkes kun av mikrobiota i tarmen [50, 61]. Undertrykking av AMPK av mikrobiota og redusert fettsyreoksidasjon i skjelettmuskler er en annen hypotese bak utvikling av fedme i mus med mikrobiota. *Backhed et al.* demonstrerte i sin studie at steril mus var beskyttet mot høyfettdiett-indusert fedme, IR og dyslipidemia. I muskler ble det funnet store mengder av fosforylert AMPK, fosforylert ACC (inaktiv form) og økt CPTI som tydet på økt fettsyreoksidasjon (Beskrevet i avsnitt 1.3) [63].

1.8 Mønsterkjenningsreseptorer (PRRS)

Immunsystemet er viktig for å beskytte oss mot patogene inntrengere i kroppen ved å eliminere skadelige mikroorganismer [68]. Kroppen har to typer immunsystem, medfødt og adaptivt immunsystem. Det medfødte immunsystemet er et ikke spesifikt immunsystem og aktiveres av molekyl-/ bakteriestrukturer som er fremmede for kroppen, men som for eksempel finnes i mikroorganismer eller er deler av bakterier [1]. Fagocytter, makrofager og andre immunceller medierer det medfødte immunsystemet. Det adaptive (spesifikke) immunsystemet er strukturgjenkjenning og eliminering av spesifikke patogene inntrengere i kroppen i den senere del av infeksjonen og avhengig av immunologisk hukommelse [42].

Gjenkjennelse av mikrobielle patogener er en avgjørende faktor for initiering av det medfødte immunsystemet og medieres av mønsterkjenningsreseptorer, pattern recognition receptors, (PRRs) intracellulært eller ekstracellulært [42]. PRRs gjenkjenner og binder til to molekylstrukturer, PAMP (pathogen associated molecular pattern) og DAMP (danger associated molecular pattern). PAMPs er spesifikke strukturer/komponenter fra patogene mikroorganismer eller virus [69], mens DAMPs er molekylstrukturer som skilles ut av døde celler og avgir faresignaler som initierer inflammasjonsresponsen. DAMPs inneholder komponenter fra reaktiv oksygenforbindelser (ROS), adenosin trifosfat (ATP), urinsyrekrystaller eller skadelige miljøfaktorer som UV stråling [70]. PAMPs inneholder komponenter fra bakteriecellevegg som lipopolysakkarid (LPS), lipoteikoinsyre (LTA) og peptidoglykan (PGN)), spesialiserte proteiner (flagellin) eller nukleinsyrestrukturer spesifikk for bakterier og virus [69].

PRR utgjør førstelinjeforsvaret som er nødvendig for å drepe mikroorganismer. Det er kjent fire familier av PRRs og alle er transmembranproteiner. Nukleotid-binding og oligomerisering domene (NOD)-like reseptorer (NLRs) og Toll-like reseptorer (TLRs) er blant de viktigste PRRs, som samtidig å være en del av immunsystemet, også er involvert i patogenese ved fedme og T2D [42]. TLRs er veldig spesifikke til å gjenkjenne patogene strukturer, men endogene molekyler av ikke-mikrobiell opprinnelse fra vevssår og mettede fettsyrer som laurinsyre og palmitinsyre kan også aktivere TLRs, øke ekspresjon av pro-inflammasjonsmediatorer og initiere såkalt steril inflammasjon [71]. NLRs og TLRs er involvert i inflammasjon som medierer IR. Det er kun NLRs som blir beskrevet videre i denne oppgaven [42].

1.8.1 NLRs

NLR er intracellulære cytosoliske proteiner [69]. Det er kjent 22 NLRs hos mennesker, og de har en karakteristisk tredelt struktur [72]. Et N-terminalt protein-protein domene, et sentralt NBS-domene (også kjent som NOD domene) [73], og et C-terminalt leucin-rikt repeterende (LRRs) domene. LRRs gjenkjenner patogene deler av bakterien og binder liganden. Når ligand binder seg til LRR undergår LRR en konformasjonsendring og fører N-terminalt domene til å inngå interaksjon med nedstrøms adaptorer eller effektorer. Dette fører til oligomerisering i sentralt NOD domene og danner et protein kompleks [72, 74]. LRR er en autoinhiberende repressor som automatisk kommer tilbake til opprinnelig form og inaktiverer NLR ved å hemme NOD mediert oligomerisering [68].

NLR er delt videre i 4 subfamilier basert på variasjon i deres N-terminale domene, NLRA med et syretransaktiveringsdomene, NLRB med bakulovirus inhibitor repeat (BIR), NLRC med caspase aktivering rekrutteringsdomene (CARD) og NLRP med pyrimindomene (PYD) [72](Fig.1.6). NOD1 og NOD2 tilhører subfamilien NLRC. NOD1 skiller seg fra NOD2 ved at NOD1 inneholder 1 CARD domene, mens NOD2 inneholder to CARD domener som rekrutterer kinaser til å mediere nedstrøms signalering [72].



Figur1.6: Karakteristisk tredelt struktur til NOD1- og NOD2-reseptorer (venstre) og adaptormolekyl både for NOD1- og NOD2-reseptorer (høyre). CARD; et N-terminalt caspase aktivering rekrutteringsdomene, NBS, et sentralt nukleotid-bindingssete; LRR; et C-terminalt leucin rikt repeterende domene. Figuren er hentet fra [75].

1.8.2 NOD1

NOD1 uttrykkes i alle celler og detekterer patogene bakterier ved å gjenkjenne en komponent fra peptidoglykan (PGN), en dipeptid γ -D-glutamyl-mesodiaminopimelinsyre (iE-DAP) [74]. iE-DAP er en uvanlig aminosyre som er en spesifikk PGN-del hos de fleste gram-negative bakterier, men kun få spesifikke gram-positive bakterier, inkludert *Listeria* og *Bacillus* [69, 74]. *Shigella flexneri*, *entroinvasiv Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Helicobacter pylori* er noen bakterier som gjenkjennes av NOD1. Bakterier må frigjøre iE-DAP intracellulært for å aktivere NOD1 med caspase rekrutterings domene 4 (CARD4) [69].

1.8.3 NOD2

NOD2 uttrykkes i monocytter, makrofager, dendrittiske celler og tarm Paneth celler, (epitelceller tynntarmen) [74]. NOD2 detekterer patogene bakterier ved å gjenkjenne et muramyldipeptid (MDP), en vanlig PGN-komponent som finnes seg både hos gram-negative og gram-positive bakterier [69]. *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* og *Mycobacterium tuberculosis* er noen bakterier som gjenkjennes av NOD2 [76]. På tilsvarende måte som iE-DAP må MDP PGN-komponent ligge intracellulært for å aktivere NOD2 med caspase rekrutterings domene 15 (CARD15) [69].

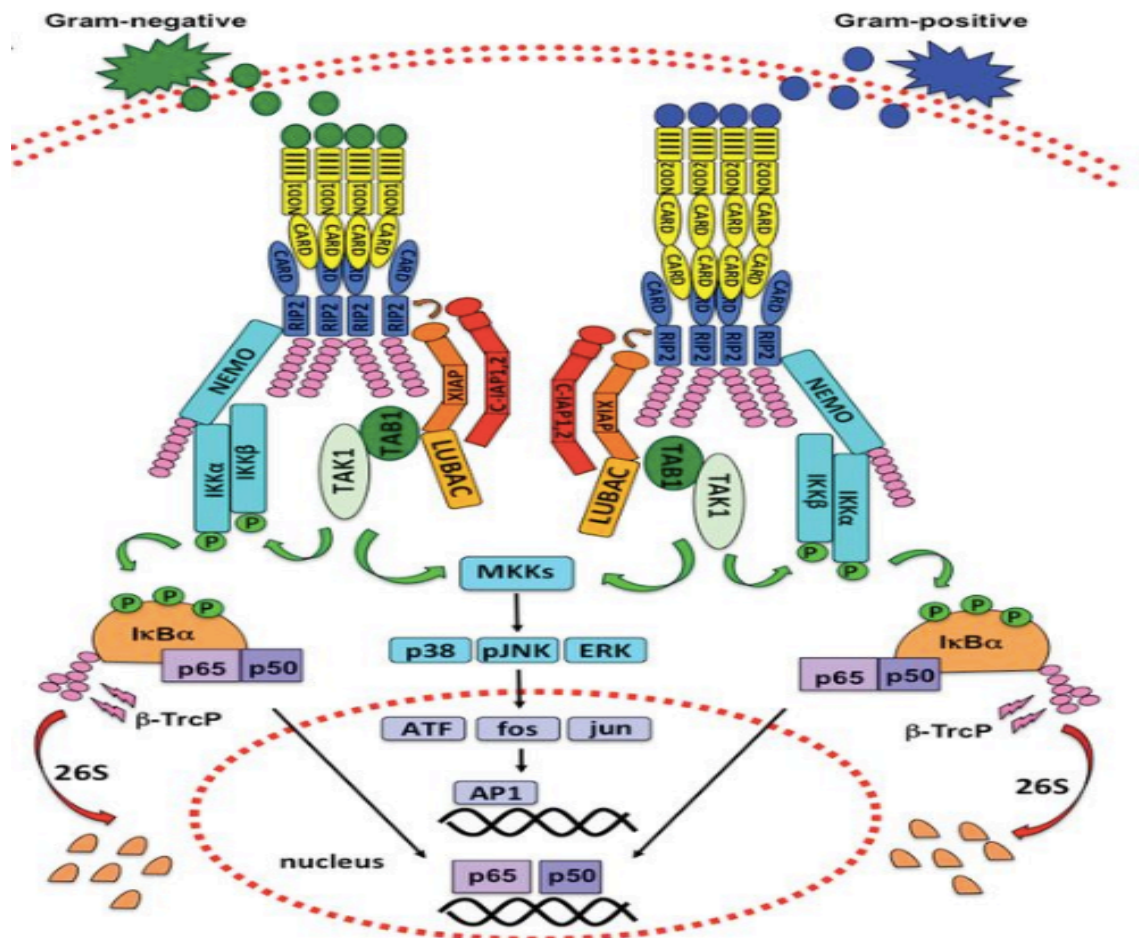
1.8.4 Signaleringsmekanismer ved NOD1-/ NOD2-aktivering

Aktivering av NF- κ B-vei er en viktig vei i regulering og koordinering av immunsystemet. Aktivering av NOD1-/NOD2-reseptorer initierer pro-inflammatorisk respons stort sett via aktivering av NF- κ B [76].

NOD1 og NOD2 aktiveres ved at LRR-domenet i reseptoren gjenkjenner og binder til spesifikke peptidoglykan-derivater, en dipeptid γ -D-glutamyl-mesodiaminopimelinsyre (iE-DAP) og muramyl-dipeptid (MDP) fra gram-positive bakterier og gram-negative bakterier. Dette fører til konformasjonsendring som resulterer i oligomerisering av reseptoren og videre interagering med nedadgående proteiner. Det rekrutteres en serin-treonin-kinase RIP2 (reseptor-interacting protein 2), kjent også som RICK (protein kinase containing a caspase recruitment domain), og via homotypisk CARD-CARD inngår interaksjon mellom NOD1/NOD2 og RIP2. RIP2 ubiquitineres av E3-ligaser og nærmer seg til I κ B kinase (IKK) kompleks. IKK-kompleks består av en regulatorisk subenhet IKK γ (NEMO) og to kinase-subenheter, IKK α og IKK β . RIP2 interagerer direkte med IKK γ og promoterer ubiquitinerings. Ubiquitinerings av IKK γ stimulerer videre kinase-aktiviteten til IKK α og IKK β -subenheter som fosforylerer NF- κ B inhibitor (I κ B α). I κ B α blir videre degradert og frigjør NF- κ B dimer som translokeres fra cytosol til kjernen for å oppregulere gentranskripsjon og produksjon av pro-inflammatoriske mediatorer involvert i beskyttelsen og apoptose [69, 72, 76, 77] (Fig.1.7).

NOD1/NOD2 er også vist å aktivere p38 MAPK, ERK (ekstracellulær-signal-regulerende-kinase) og JNK kinaser i tillegg til aktivering av NF- κ B [69].

RIP2-ubiquitinerings rekrutterer samtidig transforming growth factor-beta-activated kinase1 (TAK1) som er viktig for å aktivere I κ B kinase (IKK) kompleks og aktiverer videre NF- κ B [72, 74](Fig.1.7). TAK1 medierer i tillegg fosforylering av MAPK, som JNK, ERK og p38 MAPK. Disse kinasene translokeres til kjernen og fosforylerer områder i AP-1 [72, 77]. Begge disse veiene (NF- κ B og MAPK) antas å samarbeide om å oppregulere ekspresjon av pro-inflammatoriske molekyler til å stimulere både medfødte og adaptive responser [69]. Signaleringsintermediater involvert i aktivering av p38, ERK og JNK av NOD1 eller NOD2 er ikke godt karakterisert, men inneholder samme oppstrøms proteiner, RIP₂ og TAK1 [74] (Fig.1.7).



Figur1.7: Hovedsignaleringsveier ved NOD1- og NOD2-aktivering: NOD1- og NOD2-reseptorer aktiveres ved at LRR-domene i reseptoren gjenkjenner og binder til spesifikke deler av peptidoglykanlag, iE-DAP og MDP, fra G^+ - og G^- bakterier. Reseptoren undergår konformasjonsendring og fører til oligomerisering av reseptoren. NOD1/NOD2 interagerer videre med rekrutterende RIP_2 via homotypisk CARD-CARD interaksjon. Ubiquitinerings av RIP_2 av E3-ligaser promoterer ubiquitinerings av $IKK\gamma$ (NEMO) i IKK-kompleks. $IKK\gamma$ stimulerer videre kinaseaktiviteten til $IKK\beta$ og $IKK\alpha$ som fosforylerer NF- κ B inhibitor ($I\kappa B\alpha$). $I\kappa B\alpha$ degraderes og frigjør NF- κ B dimer ($p65$, $p50$) som blir translokert fra cytosol over til kjernen for å oppregulere gentranskripsjon av pro-inflammatoriske mediatorer. Oligomerisering av NOD1/NOD2 og RIP_2 rekrutterer samtidig TAK1 som er viktig for å aktivere $IKK\beta$ og aktiverer videre NF- κ B. I tillegg er TAK1 involvert i aktivering av stress-kinaser, p38, JNK, ERK som fosforylerer områder i AP-1 i kjernen.

RIP_2 : reseptor-interacting protein 2, CARD: caspase-aktivering rekrutteringsdomene, E3-ligaser; (cIAP)1 og 2: cellular inhibitor of apoptosis1 og 2, XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis, LUBAC: Linear ubiquitin chain assembly complex, IKK: $I\kappa B$ kinase, TAK1: transforming growth factor-beta-activated kinase1, (TAB)1: TAK1-binding protein1, JNK: c-Jun NH_2 -terminal kinase, ERK: ekstracellulær-signal-regulerende-kinase, AP-1: aktivator protein-1. Figuren er hentet fra [77].

1.8.5 Metabolske effekter av NOD1/NOD2

In vitro er det hittil gjort få studier av NOD1- og NOD2-reseptoraktivering i regulering av energimetabolisme, men det har vist en viss patofysiologiske rolle i metabolske sykdommer som fedme og insulinresistens [27, 28, 78-82].

I muskel er det kun to studier, så vidt vi vet, gjort på regulering av energimetabolisme. Det ble utført på L6 rottemyotuber hvor NOD1 og NOD2 var lite uttrykt i forhold til makrofager. Det ble vist i den ene av disse studiene at NOD2-aktivering førte til IR i L6-muskelceller. Hovedfunnene var redusert insulinstimulert glukoseopptak, translokasjon av GLUT4, Akt Ser⁴⁷³ fosforylering og IRS-1 tyrosinfosforylering på proteinnivå som indikerte hemming av insulinsignaler. Videre ble det funnet degradering av I- κ B, økt proinflammatoriske cytokiner med økt mRNA ekspresjon av TNF- α , IL-6, IL-8 i tillegg til økt aktivering av inflammasjonsmarkører som JNK, p38 MAP kinaser (proteinnivå) [27]. Det ble ikke vist noen effekt av NOD1-aktivering. I den andre studien, fra samme forskningsgruppe, ble det vist at NOD2-reseptorer i L6-muskelceller induerte ROS og medførte mitokondriedysfunksjon blant annet. Dette tyder på at NOD2 kan være involvert i utvikling av IR i L6-muskelceller [29].

I tillegg til effektene på L6-rottemyotuber har også effektene til NOD1- og NOD2-aktivering blitt undersøkt i andre vev og celler av både animalsk og human opprinnelse (fettceller, hjertemuskel, hjertemuskelceller og leverceller [28, 78, 79, 82]. NOD1-aktivering ga IR i 3T3-L1-fettceller og leverceller fra mus i tillegg til fettcellene fra menneske [28, 79, 83]. Det er rapportert økt uttrykt av NOD1 og inflammasjonsmediatører i fettceller og fettvev hos fettrik diett-indusert overvektige mus [79]. Dette tyder på NOD1 er involvert i fettrik diett-indusert inflammasjon og videre i utvikling av fedme, IR og hjerte- og karsykdommer.

1.9 Formål med oppgaven

Det er stor interesse for å finne mekanismene involvert i utvikling av T2D, og dermed nye behandlingsmåter basert på nye angrepspunktene. Aktivering av det medfødte immunsystemet er sterkt assosiert med fedme, IR og diabetes. Ny forskning anser en familie av reseptorer i det medfødte immunsystemet, NLR, å være involvert i denne assosiasjonen. NOD1 og NOD2, medlemmer av NLR er undersøkt og har vist effekter på celler av både animalsk og human opprinnelse på glukosemetabolisme [28, 79, 82, 83]. I en studie demonstrert av Tamrakar et al. reduserte NOD2-aktivering insulinstimulert glukosemetabolisme på L6-rotte muskelceller [27].

Hittil er det, så vidt vi vet, ikke gjort noen studier på human skjelettmuskelceller hvor betydningen av NOD1 og/eller NOD2 for energimetabolisme er undersøkt. I og med at skjelettmuskulatur utgjør omtrent halvparten av kroppens masse og er et sentralt organ hvor energimetabolisme foregår, er det av stor interesse å finne effekter av NOD1- og NOD2-ligander på regulering av fettsyre (oljesyre)- og glukosemetabolisme i skjelettmuskulaturen, samt deres rolle på insulinstimulert glukosemetabolisme og insulinsignalveien.

Følgende delmål ble satt for denne oppgaven:

- Studere eventuelle effekter av NOD1- og NOD2-ligander på basalt og insulinstimulert glukoseopptak og glukoseoksidasjon i humane myotuber fra friske forsøkspersoner.
- Studere eventuelle effekter av NOD1- og NOD2-ligander på oljesyreopptak og oljesyreoksidasjon i humane myotuber fra friske forsøkspersoner.
- Studere effekten av NOD1- og NOD2-ligander på insulinstimulert fosforylering av Akt i humane myotuber.

2.Materialer og metoder

2.1 Materialer

2.1.1 Kjemikalier og reagenser

Tabell 2.1: Kjemikalier og reagenser som er benyttet i denne oppgaven.

| Leverandør | Kjemikalier/reagenser |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| BioRad Laboratories Inc- (Hercules, CA, USA) | Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate |
| | Clarity™ Western ECL Blotting substrate |
| | Mini-PROTEAN® TGX™ gradientgeler (4-20% akrylamid) |
| | Precision Plus Protein™ Standard Dual Color |
| Cell Signaling Technology® Inc.(Danvers, MA, USA) | Rabbit Phospho-Akt (Ser 473) Antibody |
| | Anti-rabbit IgG, HRP linked Antibody |
| | Akt Antibody |
| | α-tubulin Antibody |
| Gibco®, Invitrogen Gibco, Life Technologies (Paisley, Skottland, Storbritannia) | ”Dulbecco’s Modified Eagle medium” med glutamax” (DMEM/Glutamax-I 1g/L glukose) |
| | Dulbecco’s fosfatbufret saltløsning (DPBS uten Ca ²⁺ og Mg ²⁺) |
| | Fungizone® (250µg/mg amphotericin B) |
| | Føtalt kalveserum |
| | Hanks balanced saltløsning (HBSS) uten Ca ²⁺ og Mg ²⁺ |
| | Penicillin- streptomycin (10 000IE/ml) |
| | Trypsin 0,05% konsentrasjon |
| InvivoGen (San Diego, California, USA) | NOD1-agonist (C12-iE-DAP, C12 dipeptid Y-D-glutamyl-mesodiaminopimelinsyre) |
| | NOD2-agonist (L18-MDP, L18 muramyl dipeptid) |
| | NOD1/2-agonist (peptidoglykan fra <i>E. coli</i> K12, PGN- ECndi) |

| | |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Lonza (Verviers, Belgia) | BioWhittaker [®] PBS (fosfatbufret saltløsning) |
| Merck Millipore (Billerica, MA, USA) | Natriumhydroksid (NaOH) |
| Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Danmark) | Actrapid [®] Penfill [®] 100IE/ml |
| Pall Life Sciences (Cergy-Saint-Christophe, Frankrike) | Ultroser [™] G |
| PerkinElmer [®] (Boston, MA, USA) | Glukose, D-[¹⁴ C(U)] 2,9 mCi/mmol (100 µCi/ml) |
| | Oljesyre, [1- ¹⁴ C] 56,3 mCi/mmol (100 µCi/ml) |
| PerkinElmer [®] (Shelton, Scotland, USA) | OptiPhase Supermix |
| Sigma-Aldrich [™] (St. Louis, MO, USA) | 4-(2-hydroksyetyl)-1-piperazinetansulfonsyre (HEPES) |
| | Bovint serumalbumin (BSA) |
| | Bromfenolblått |
| | β-merkapttoetanol |
| | Dimetylsulfoksid (DMSO) |
| | Glukose |
| | L- karnitin hydroklorid |
| | Oljesyre |
| | Protease inhibitor Cocktail |
| | Phosphatase inhibitor Cocktail 2 |
| | Trypanblått 0,4 % løsning |

2.1.2 Utstyr

Tabell 2.2: Utstyr som er benyttet i denne oppgaven.

| Leverandør | Utstyr |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) | ChemiDoc™ XRS + System with Image Lab™ Software |
| Corning Inc. (Corning, NY, USA) | Corning® CellBIND® Surface 96-brønners brett med lokk |
| | Centrifuge Tube w/CentriStar Cap™ 15 ml |
| | Centrifuge Tube w/CentriStar Cap™ 50 ml |
| Eppendorf AG (Hamburg, Tyskland) | Safe-Lock rør 1,5 ml |
| GE Healthcare (Germany, UK) | Amersham™ Protran™ 0,45 µm nitrocellulose blotting membrane |
| Gibco®, Invitrogen™ (Gibco, Life Technologies, Eugene, OR, USA) | Countess™ counting chamber slides |
| Gibco®, Invitrogen™ (Gibco, Life Technologies, Paisley, Skottland, Storbritannia) | Countess automated cell counter |
| GraphPad software, Inc. (La Jolla, CA, USA) | GraphPad Prism version 6 for PC og Mac |
| Instrumentverkstedet (Teknisk avdeling, Universitetet i Oslo, Norge) | Trappestativ og utstyr (metallplate, metallskruer, silikonplate) |
| Kubota Corporation (Tokyo, Japan) | Kubota Compact Tabletop Centrifuge 2010 |
| Olympus (Tokyo, Japan) | Olympus CKX41 mikroskop med digitalkamera |
| PerkinElmer™ (Shelton, Scotland, USA) | 2450 Microplate Counter MicroBeta2® |
| | Isoplate™ -96 |
| | Topseal® -A gjennomsiktig film |
| PerkinElmer™ (Shelton, Scotland, USA) | Unifilter® - 96 GF/B |
| | Victor™ X4 Multimode Plate Reader |
| Thermo Scientific (Roskilde, Danmark) | Nanodrop Lite Spectrophotometer |
| | NUNC 75 cm ² celleflasker |
| | NUNC 96-brønners brett med flat bunn |
| | Reagent Reservoirs with Dividers 25ml |
| VWR® International (Radnor, PA, USA) | VWR Microcentrifuge MiniStar Silverline |
| | Fireboy™, Integra safety Bunsen Burner |

2.2 Celler

I denne oppgaven er det benyttet humane myotuber fra friske frivillige donorer. Donorene er fra ulike studier og navnsatt etter dette (LD, AR/AT) (tabell 2.3). Fra LD ble muskelbiopsier tatt fra bukveggen, *musculus obliquus internus abdominis* hos nyredonorer. Fra AR og AT ble det tatt muskelbiopsi fra lår, *musculus vastus lateralis* hos atleter. Totalt ble celler fra 15 donorer benyttet i denne oppgaven, både fra kvinner og menn i alderen 36-59 år. Alle donorene gav skriftlig samtykke til deltakelsen, og studiene er godkjent av regional etisk komite (godkjenning S-04133-5/2009/1095 (LD) og 2011/2207/REK sør-øst B (AR, AT)).

Tabell 2.3: Kliniske data for donorer.

| Donor | Kjønn (M/K) | Alder(år) | KMI(kg/m ²) |
|--------------|-------------|-----------|-------------------------|
| LD17 | K | 56 | 23,2 |
| LD13 | M | 53 | 27,7 |
| LD30 | M | 36 | 26,2 |
| LD12 | K | 51 | 26,2 |
| LD15 | K | 55 | 29,1 |
| LD22 | M | 40 | 28,7 |
| AR1 | M | 23 | 33,0 |
| AR6 | M | 26 | 22,2 |
| AR7 | M | 24 | 23,0 |
| AR9 | M | 23 | 27,6 |
| AR2 | M | 37 | 37,3 |
| AR3 | M | 22 | 21,2 |
| AT23 | M | 25 | 19,2 |
| AT20 | M | 29 | 23,1 |
| AT21 | M | 22 | 23,9 |
| Gjennomsnitt | | 34,8 | 26,1 |

KMI, kroppsmasseindeks

2.3 Cellebankopprettelse

Det ble først opprettet en cellebank fra muskelbiopsier til alt forskningsbasert arbeid. Satellittceller ble isolert fra muskelbiopsier og aktivert til prolifererende myoblaster i kultur og dyrket i flere passasjer. Myoblastene ble deretter merket med donortype med et identifikasjon- og passasjennummer og ble oppbevart i en nitrogentank ved -196°C .

2.3.1 Oppskalering

Celleampuller à 1 ml ble tatt fra nitrogentanken og raskt tint ved 37°C på vannbad. Hele celleinnholdet fra 1 ml ampulle ble overført til et 50 ml rør og 5 ml utsåingsmedium (appendiks 1.1) ble tilsatt forsiktig som drypp. Røret ble deretter sentrifugert ved 1300g i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet og cellepelletten resuspendert i 4 ml utsåingsmedium. Dette ble videre fordelt til 4 NUNC 75 cm^2 celleflasker med 1 ml i hver flaske som allerede var tilsatt 9 ml utsåingsmedium. Etter omtrent 24 timer ble utsåingsmediet skiftet til proliferasjonsmedium (appendiks 1.2). Proliferasjonsmediet ble skiftet etter 2-3 dager inntil cellene var 50-60 % konfluente. Da ble proliferasjonsmediet skiftet til et spesielt skjelettmuskelcellemedium inneholdende vekstfaktorer (SkGM, appendiks 1.4) inntil cellene nådde 80-90 % konfluens. SkGM ble benyttet for å unngå spontan differensiering fra myoblaster til myotuber. Da cellene nådde 80-90 % konfluens, ble myoblaster nedfrosset i 1 ml fryserør (kryorør) i nitrogentanken, -196°C , for eventuell videre oppskalering eller forsøk på et senere tidspunkt.

2.3.2 Nedfrysning av celler

Mediet i flaskene ble først fjernet og cellene ble vasket 2 ganger med 5 ml Hank's balanced saltløsning (HBSS) uten Ca^{2+} og Mg^{2+} . Deretter ble 5 ml 0,05 % trypsin tilsatt for å løse cellene fra plastoverflaten. Løsningen ble fordelt utover plastoverflaten, og 75 cm^2 -celleflaskene ble inkubert ved 37°C , 5 % CO_2 i maksimum 5 minutter. Cellene ble videre kontrollert i et lysmikroskop (Olympus) for å se om de var løsnet fra plastoverflaten. Etter at cellene hadde løsnet fra plastoverflaten, ble det tilsatt 5 ml utsåingsmedium til hver av 75 cm^2 NUNC-celleflaskene for å inaktivere trypsinløsningen. Cellesuspensjonen fra hver av 75 cm^2 NUNC-celleflaskene ble overført til et 50 ml rør. 20 μl av celsuspensjonen ble blandet i likt forhold med 4 % tryptanblått i et eppendorfrør og tellet i tellekammer i Countess™ Automated Cell Counter. Utfra celletallet per ml gitt i automatisk celledeteller beregnet man

mengden på frysemediet (appendiks 1.5) det trengtes til 1 ml sterile kryorør med $1,1 \times 10^6$ celler per rør. Cellesuspensjonen ble så sentrifugert ved 1300g i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet og cellepellet ble resuspendert i det beregnede frysemedium. 1ml av cellesuspensjonen ble overført til sterile kryorør (1ml) som umiddelbart ble nedfrosset ved -80°C i Mr. Frosty™ Freezing Countainer (Thermo Scientific) som inneholdt isopropanolol. Dette sikret gradvis nedkjøling ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Etter 4 timer ble alle kryorør overført til nitrogen tanken ved -196°C for langtidslagring.

2.3.3 Telling av celler

Celletall på levende skjelettmuskelceller ble estimert ved hjelp av Countess™ Automated Cell Counter. I et eppendorfrør ble 20 μl av cellesuspensjonen blandet med 20 μl 4 % tryptanblått farge hvorav 20 μl ble fylt i et tellekammer som videre ble satt i en celledeller. Celledelleren angir levende og døde celler per ml og viabilitet i %. Den ønskede viabilitet var på $>75\text{--}80\%$. Tryptanblått er et lysabsorberende blå-fiolett vannløselig stort molekyl som kun trenger seg inn i uinntakte celler og kan da lett skille mellom levende og døde celler hvor døde celler er farget blå.

2.4 Celledyrking

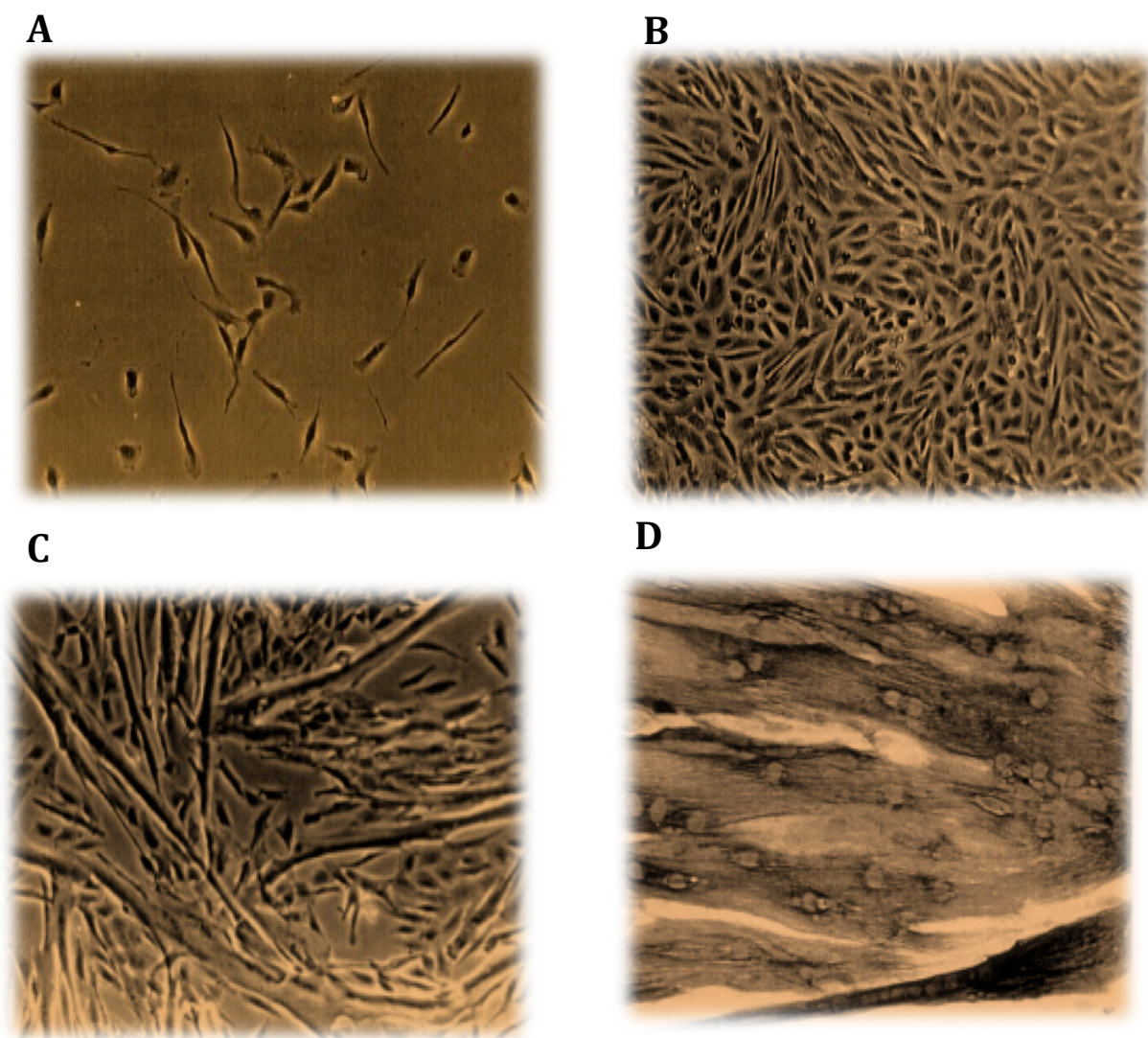
2.4.1 Utsåing

Utsåingsmediet ble først overført til et 50 ml rør i en LAF-benk og ble varmet opp på vannbad ved 37°C . Deretter ble celleampuller tatt ut fra nitrogen tanken og lokket skrudd opp for å utligne trykket. Celleampuller ble raskt tint ved 37°C på vannbad. Etter at cellene var tint, ble hele celleinnholdet i ampullen raskt overført til et 50 ml rør og 5 ml utsåingsmediet ble tilsatt som ”drypp”. Røret ble sentrifugert ved 1300g i 7 minutter og supernatanten som inneholdt dimetylsulfoksid (DMSO) ble fjernet. Cellepellet ble deretter resuspendert i 5 ml utsåingsmedium og blandet godt med en 5 ml stripette. Av cellesuspensjonen ble det tatt ut 20 μl og blandet 1:1 med tryptanblått (4 %) i et sterilt eppendorfrør. Antall celler ble telt ved hjelp av celledelleren (avsnitt 2.3.3) for å beregne volumet av cellesuspensjon til utsåing. Det ble brukt 7000 celler per brønn i 96-brønners Corning® CellBIND® Surface-brett. Beregnet volum ble overført til et nytt 50 ml rør, og utsåingsmedium ble tilsatt i beregnet volum. Alt ble blandet forsiktig og overført i et reservoar før 100 μl cellesuspensjon ble tilsatt i hver celleplatebrønn med en multikanalpipette. Celleplaten ble studert i lysmikroskopet for å se

om cellene var overført før den ble satt til inkubasjon ved 37°C, 5 % CO₂ under fuktige betingelser.

2.4.2 Proliferasjon og differensiering

Utsåingsmedium er et mer næringsrikt medium enn proliferasjonsmediet og blir benyttet for at cellene skal feste seg til overflaten og begynne å vokse. Etter omtrent 24 timer ble utsåingsmediet byttet til proliferasjonsmedium som får cellene til å proliferere. Proliferasjonsmediet ble skiftet etter 2-3 dager inntil cellene nådde 80-90 % konfluens (Fig. 2.1B). På dette tidspunktet ble proliferasjonsmediet byttet til differensieringsmedium (appendiks 1.3). Differensieringsmediet skiller seg fra proliferasjonsmediet ved at det inneholder insulin og mindre serum som får myoblaster til å bli myotuber. Cellene slutter å dele seg, og blir til store flerkjernede muskelfibre liggende i en mer ordnet systematisk struktur (Fig.2.1 C,D). Differensieringsmediet ble skiftet annenhver dag i omtrent 1 uke og ved hjelp av lysmikroskop ble celledifferensiering bekreftet morfologisk før forsøket ble satt i gang.



Figur 2.1: Bilder av humane skjelettmuskelceller fra mikroskopet under utsåing-, proliferasjon- og differensieringsfase: **A:** Muskelceller etter 24 timer i utsåingsmedium. Bildet er tatt med 10×forstørrelse. **B:** Muskelceller etter 7 dager i proliferasjonsmedium like før bytte til differensieringsmedium. Cellene er blitt 80-90 % konfluente. Bildet er tatt med 10×forstørrelse. **C:** Muskelceller etter 3 dager i differensieringsmedium. Bildet er tatt med 10×forstørrelse. **D:** Muskelceller er blitt til flerkjernede myotuber og er ferdig differensiert etter 7 dager. Bildet er tatt med 40×forstørrelse.

2.4.3 Behandling av myotuber

Før/På forsøksdagen ble cellene på 96-brønners Corning® CellBIND® Surface-brett forbehandlet med bakterieprodukter NOD1/2-ligand (peptidoglykan fra E.coli K12, PGN-ECndi), NOD1-ligand (C12 dipeptid Y-D-glutamyl-mesodiaminopimelinsyre, C12-iE-DAP) og NOD2-ligand (L18-MDP, L18 muramyl dipeptid)) i varierende tid (1-24 timer) i inkubator ved 37°C, 5% CO₂ før selve substratoksidasjonsforsøket (se avsnitt 2.5). Det er

benyttet bakterieprodukter innenfor konsentrasjonsområdet 1 ng-1 µg og kun differensieringsmedium ble brukt som kontroll.

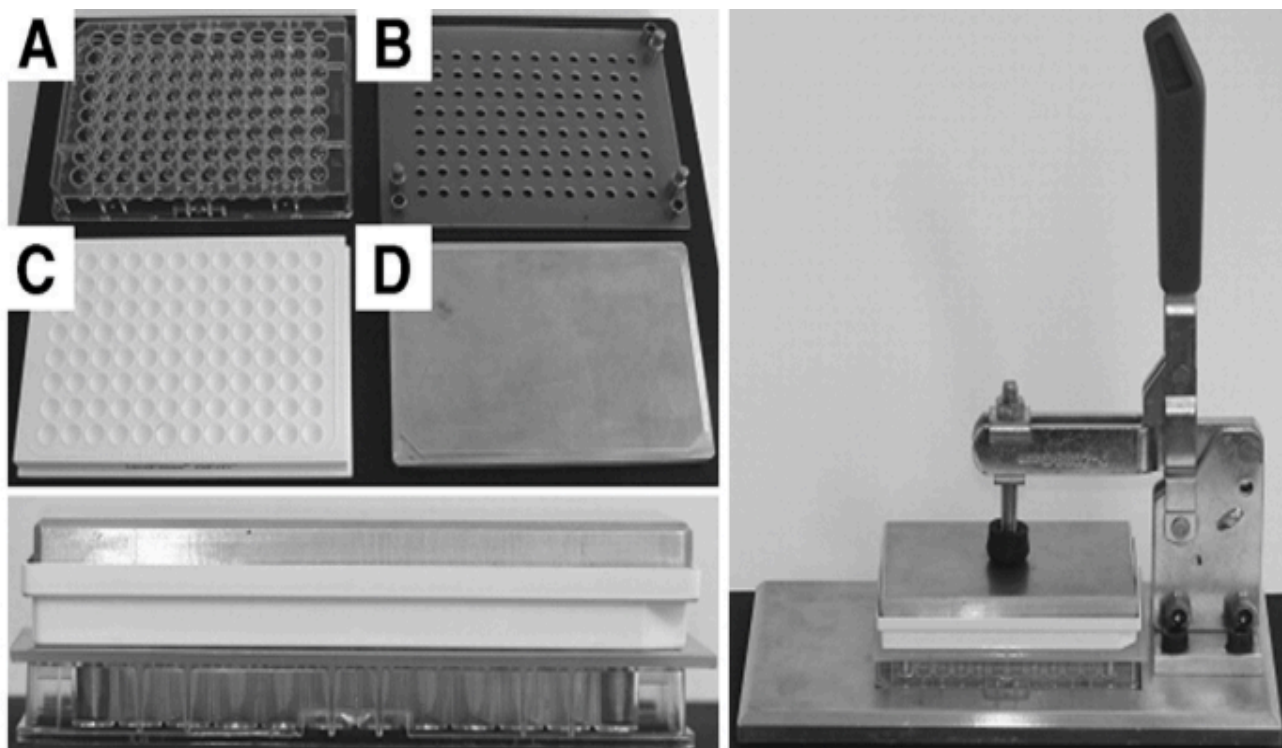
I noen forsøk ble cellene forbehandlet med NOD1- og NOD2-ligander i kombinasjon med 25 mM glukose (hyperglykemi, HG) eller 100 µM palmitinsyre (PA). Under akutt-forsøkene ble cellene behandlet med NOD1- og NOD2-ligander under substratoksidasjonsforsøket, slik at det var ingen forbehandling av cellene i disse forsøkene. I disse forsøkene ble NOD1- og NOD2-ligander tilsatt samtidig med radioaktivt medium under substratoksidasjonsforsøket.

2.5 Substratoksidasjonsmetoden

Substratoksidasjonsmetoden ble utviklet av Wensaas *et al.* i 2007 [84] og innebærer radioaktivitetsmåling av ^{14}C - radiomerkede substrater. Metoden baserer seg på at ^{14}C -merkede substrater oksideres av dyrkede, adherente, humane myotuber i et 96-brønners Corning® CellBIND®-brett, og det frigjøres $^{14}\text{CO}_2$. $^{14}\text{CO}_2$ fanges opp i et filterbrett fuktet med 1 M NaOH i et såkalt lukket trappesystem (Fig.2.2). Mengden $^{14}\text{CO}_2$ som fanges opp, måles ved hjelp av PerkinElmer 2450 microplate Counter Micro Beta²®. Metoden benyttes til å måle både ^{14}C -merket glukose og oljesyre som blir oksidert av skjelettmuskelceller. Oppsett for metoden er vist i Figur.2.2 og prinsippet bak metoden er illustrert i Figur 2.3.

2.5.1 Utførelse av CO₂-trapping

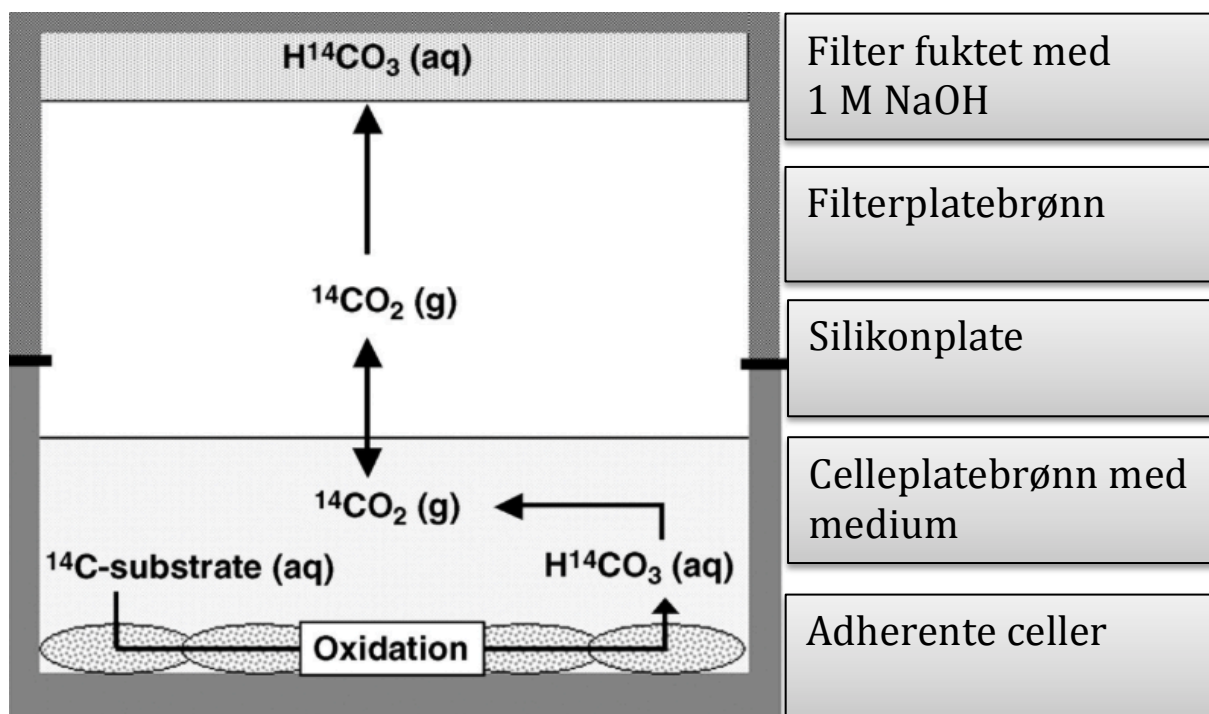
Etter forbehandling i en gitt inkubasjonstid, ble differensieringsmedium med NOD-ligander først fjernet før 50 µl av radioaktivt medium ble tilsatt i hver brønn. Corning® CellBIND® 96-brønnersbrettet ble deretter plassert nederst på trappeholderen med en sikring satt i hvert hjørne. En silikonplate ble lagt over brettet og stabiliserte ved at sikringene ble låst.



Figur 2.2: Oppsett for trapping: Til venstre er alle deler som lager en såkalt “sandwich” vist. **A:** Corning® CellBIND® 96-brønners brett, **B:** Silikonplate med metallknotter, **C:** Unifilter® fuktet med 20 µl 1M NaOH. **D:** Metallplate for å påføre et jevnt fordelt trykk på “sandwich”. Til høyre vises alle delene sammensatt til en såkalt “sandwich ved hjelp av trappeholderen. Hentet fra [84].

Over silikonplaten ble det plassert et 96-brønners UniFilter® brett som var fuktet med 20 µl M NaOH i hver brønn, og det ble påført et jevnt trykk av en metallplate over filterbrettet. Alt ble sammenslått til en såkalt “sandwich” slik at det ble dannet et lufttett system.

Hele stativet ble deretter satt i inkubator i 4 timer ved 37°C med 5 % CO₂ under fuktige betingelser. Under inkubering vil adherente cellene i brettet ta opp radioaktiv ¹⁴C-merket substrat som oksideres videre til CO₂ og fanges som H¹⁴CO₃ i basisk løsning (NaOH) i filteret (Fig.2.3). Etter 4 timer demonteres alle delene i “sandwichen”. Radioaktivt trappemedium som ble tilsatt i brønnene ble fjernet, og cellene vasket 2 ganger med 150 µl fosfatbufret salin (PBS) (appendiks 2.3). Deretter ble cellene lysert med 200 µl 0,1 M NaOH i hver brønn og nedfrosset ved -20°C. Unifilter® brett ble tilsatt 40 µl Optiphase supermix tellervæske i hver brønn og dekket med Topseal®-A gjennomsiktig film. Optiphase supermix omdanner ¹⁴C-desintegrasjoner til lyssignal og ¹⁴CO₂ ble målt 2 dager senere etter inkubasjon ved romtemperatur ved hjelp av PerkinElmer 2450 microplate Counter Micro Beta²®. Prinsippet bak substratoksidasjonsmetoden er illustrert i Figur 2.3.



Figur 2.3: Prinsippet bak CO₂-trapping: Adherente cellene tar opp radioaktivt ¹⁴C-merket substrat som oksideres. Det frigjøres ¹⁴CO₂-gass (g). ¹⁴CO₂(g) fanges opp i basisk løsning på toppen av Unifilter®. Det som ikke oksideres, akkumuleres i adherente celler og blir liggende igjen i det nederste laget, såkalt celleassosiert (CA) substrat. Figuren er hentet fra [84].

2.5.2 Celleassosiert radioaktivitet

Celleassosiert radioaktivitet (¹⁴CA) er den mengden radioaktivitet som adherente celler akkumulerer og som forblir liggende igjen i det nederste cellelaget i figur 2.3. Sammen med ¹⁴CO₂ (g) gir ¹⁴CA et estimat på total glukose- og/eller oljesyreopptak ¹⁴CA+¹⁴CO₂ (g) i cellene.

Nedfrosne cellelysater ble tint, og 50 µl av cellelysatene i hver brønn ble overført til et 96-brønners Isoplate™ brett fra kolonne 2 - kolonne 11 ved hjelp av en multikanalpipette. For å få et tall på total radioaktivt i mediet gitt til cellene i utgangspunktet, ble 50 µl av mediet tellet sammen med cellelysatene. Det ble tilsatt 100 µl Optiphase Supermix tellvæske i alle brønnene og 96-brønners Isoplate™ brett ble dekket med en gjennomsiktig Top Seal®-A film. Etter 2 timer inkubering ved romtemperatur ble ¹⁴CA målt ved hjelp av PerkinElmer 2450 microplate Counter Micro Beta²®.

Følgende radioaktive medier ble benyttet i denne metoden:

Glukose, D-[^{14}C (U)] 2,9 mCi/mmol (100 $\mu\text{Ci/ml}$) fra PerkinElmer[®]: Det er benyttet 200 μM glukose som den endelige glukosekonsentrasjon i hver brønn ved alle glukoseforsøkene. Dette tilsvarte 200 μM D-[^{14}C (U)] glukose (appendiks 2.1). Dessuten ble det utført \pm 100 nM insulin ved alle D-[^{14}C (U)] glukoseforsøkene.

Oljesyre, [1- ^{14}C] 56,3 mCi/mmol (100 $\mu\text{Ci/ml}$) fra PerkinElmer[®]: Det er benyttet 100 μM oljesyre som den endelige oljesyrekonsentrasjon i hver brønn ved alle oljesyreforsøkene. Dette tilsvarte 18 μM [1- ^{14}C] oljesyre og 82 μM ikke radioaktiv oljesyre (kald) (appendiks 2.2).

2.5.3 Bradfords metode for proteinmåling

Proteinmåling er en metode utviklet av Marion Bradford i 1976 for kvantifisering av proteinmengde [85]. Metoden ble benyttet i substratoksidasjonsforsøkene for å korrigere for celleantall i hver brønn, og proteinkonsentrasjon angis som mg/ml. Høye celletall vil forventes å gi høye proteinkonsentrasjoner, mens lav celletall vil gi lave proteinkonsentrasjoner.

Det ble laget proteinstandarder av bovint serumalbumin (BSA) med kjent konsentrasjon 0 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$ og 160 $\mu\text{g/ml}$ ut fra en 2000 $\mu\text{g/ml}$ bovin serum albumin (BSA) standardløsning løst i 0,1 M NaOH. Disse ble oppbevart i fryseren. Ved proteinmåling ble cellebrett med lyserte celler og ferdiglagde proteinstandarder satt til tinning.

Etter tinningen ble cellelysate blandet godt med multikanalpipette. På en NUNC[®] 96-brønners mikrotiterplate ble kolonne 1-2 benyttet til proteinstandarder hvor to paralleller av hver proteinkonsentrasjon på 50 μl ble tilsatt i hver rad nedover. I kolonne 3-12 ble 50 μl av cellelysaten tilsatt i hver celleplatebrønn med en multikanalpipette. I alle brønnene ble det tilsatt 200 μl Bio-Rad Protein Assay Reagent Concentrate fortynnet 1:5 i vann (10 ml Protein reagens, 40 ml vann). Etter 5 minutter inkubering ved romtemperatur ble absorbans målt på spektrofotometer Wallace Victor[™] ved 595nm.

Bio-Rad Protein Assay Reagent inneholder en sur løsning Coomassie[®] Brilliant BLUE G-250 som vil reagere med basiske og aromatiske aminosyrer i proteiner, særlig arginin, og gi fargeomslag fra rødt til blått ved proteinbinding, med absorpsjonsmaksimum i område 465

nm-595nm. Forskjell i fargeomslag forekommer som respons på forskjellige proteinkonsentrasjoner i prøvene. Spektrofotometeret Wallac VictorTM PerkinElmer genererte en polynomisk standardkurve basert på proteinstandarder til beregning av ukjente proteinkonsentrasjoner.

2.6 Western blotting

Westernblotting eller immunblotting er en teknologisk metode i molekylærbiologi som anvendes til å identifisere og semikvantifisere et spesifikk protein fra en proteinblanding i vev, organ eller celler. Metoden kan også brukes til å evaluere størrelsen av et protein av interesse og måle mengden protein uttrykt [86]. Natriumdodecylsulfat (SDS) er en detergent som denaturerer proteiner under koking og gir hele molekylet en negativ ladning slik at de blir separert kun etter størrelsen under gelelektroforese i et elektrisk felt. β -merkaptoetanol bryter alle disulfidbindinger som holder proteiner på plass i den tredimensjonale strukturen slik at de ikke gjendannes. Glycerol øker viskositeten og gjør det lettere å få prøvene ned i brønnene i gel og i tillegg tilsettes buffer for å justere pH i gelen. Polyakrylamidgel blir benyttet i gelelektroforese som separerer denaturerte, negativt ladede proteiner etter molekulstørrelse. Etter separasjonen, blir proteinene i gelen overført til en nitrocellulosemembran i et blottingsapparat. Metoden er kalt for blotting etter dette trinnet. I og med at nitrocellulosemembranen har tendens til å suge til seg proteiner, blir membranen blokkert med Blotto (appendiks 3.4) som dekker membranens alle andre steder hvor det ikke er overført proteiner. Blokking med Blotto vil hindre uspesifikk binding av antistoffet til andre steder på membranens enn det spesifikke proteinet man er interessert i. Et primærantistoff tilsettes mot det spesifikke proteinet man er interessert i å detektere. Det etterfølges av et vasketrinn som fjerner ubundet primærantistoff. Deretter tilsettes et sekundært antistoff tilkoblet et enzym, "Horseradish Peroxidase" (HRP), som binder spesifikt til det primære antistoffet. Ved tilsetning av et luminiserende stoff "Enhanced chemiluminescence" (ECL) som er et substrat til HRP foregår oksidasjonsreaksjoner og oksiderer til slutt luminol og danner et lyserende kompleks som lett kan detekteres ved hjelp ChemiDocTM XRS⁺. Det er dette trinnet som tillater et spesifikk protein å bli detektert fra en blanding av proteiner.

Identifisering av protein skjer ved å sammenligne molekulstørrelsen til båndene i forhold til en molekulvektstandard, mens kvantifisering utføres ved å måle relativ lysintensiteten til båndene som detekteres. I denne oppgaven benyttet vi westernblotting for å kvantifisere

fosforylert Akt/PKB etter å ha behandlet myotubene med 100 nM insulin i 15 minutter. Relativ lysintensiteten beregnes ved å dividere lysintensiteten til fosforylert Akt på lysintensiteten til total Akt. Akt er et sentralt signalmolekyl nedstrøm for insulinreseptoren i myotubene hvor fosforylering av Akt spiller en særlig rolle både for glukoseopptak via GLUT4 og aktivering av glykogensyntese.

2.6.1 Høsting av celler

Det ble sådd ut satellittceller som ble proliferert og differensiert til myotuber slik det er beskrevet i avsnitt 2.4.2. Det ble benyttet 6-brønners Corning® CellBIND® surface brett med lokk hvor 1 donor ble sådd ut i 3×6-brønners brett med 2 ml utsåingsmedium i hver brønn og omtrent 10 000 celler/brønn. Myotubene ble høstet mellom dag 4 og dag 7 etter første dag i differensieringsmedium. På høstingsdagen ble differensieringsmedium sugd av, og cellene ble forbehandlet med enten NOD1-ligand 50 ng/ml i differensieringsmedium, NOD2-ligand 50 ng/ml i differensieringsmedium eller kun differensieringsmedium som kontroll. I alle 3 brettene ble det tilsatt 1 ml medium per brønn, og de ble inkubert 3 timer i inkubator. Etter 3 timer ble cellene i 3 av de 6 brønner tilsatt 100 nM insulin i DPBS med Hepes (se reagensoversikt), mens de andre 3 ble tilsatt DPBS m/Hepes i 15 minutter før høsting. Etter 15 minutter ble stimuleringen med insulin avsluttet ved at brettene ble satt på is, differensieringsmediet ble sugd av og cellene ble vasket med 2×1 ml fosfatbufret salin (PBS) i hver brønn. Rester ble sugd av før $50 \mu\text{l} - 80 \mu\text{l}$ $2 \times$ Laemmlibuffer med fosfatasehemmer og proteasehemmer (appendiks 3.1) ble tilsatt i hver brønn. Cellene ble skrapet løs med en plastskrape før cellene fra 3 brønner ble slått sammen og overført til et eppendorfrør.

Det ble 6 eppendorfrør for hver donor, 2 eppendorfrør for kontroll med og uten insulin, 2 eppendorfrør for NOD1-ligand med og uten insulin og 2 eppendorfrør for NOD2-ligand med og uten insulin. Alle eppendorfrørene ble kokt ved 100°C på vannbad i 5 minutter for å denaturere proteiner før $20 \mu\text{l}$ ble tatt ut fra hver eppendorfrør til proteinmåling. Resten av prøvevolumet i alle eppendorfrørene ble tilsatt 10 % β -merkaptoetanol og 5 % bromfenolblått. Alle rørene ble kokt ytterligere i 5 minutter for nedbrytning av disulfidbindinger. Tilslutt ble alle eppendorfrørene frosset ved -20°C.

2.6.2 Proteinmåling

Thermo Scientific Nanodrop Lite spektrofotometer ble benyttet til å måle proteinkonsentrasjon i prøvene ved UV-absorbans ved 280 nm. Eppendorfrørene ble tatt ut fra fryseren og tint. To paralleller av 1 µl sample-buffer (appendiks 3.1) ble brukt som blank prøve for å nullstille apparatet. Tilsvarende volum på 1 µl ble tatt ut fra hver prøve og proteinkonsentrasjon (mg/ml) ble målt. Etter målt proteinkonsentrasjon, ble det beregnet et prøvevolum fra hver prøve som tilsvarte 20 µg protein. Det prøvevolumet ble applisert på gel ved gelelektroforese.

2.6.3 Gelelektroforese

Det ble benyttet ferdigfremstilte Mini-PROTEAN® TGX™ gradientgeler (4-20% akrylamid) fra Bio-Rad. Før gelen ble satt i en Mini-PROTEAN® elektroforesekar ble grønn plaststrimmelen på undersiden av gelen fjernet. Elektroforesekarret ble fylt med fortynnet (1:10) elektroforesebuffer (appendiks 3.5) opptil angitt nivå og mellom gelene slik at brønnene ble fylt. Det ble tilsatt et prøvevolum i hver brønn som tilsvarte 20 µg proteinmengde. I en av brønnene på hver gel ble 5 µl av en proteinstandard (Bio-Rad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards) tilsatt. Proteinstandarden inneholder ulike proteiner med kjent molekylstørrelse (kD) slik at man kan estimere molekylvekten til proteiner man detekterer. I denne oppgaven skulle vi kvantifisere fosforylert Akt og total Akt hvor total Akt har en molekylvekt på 60 kD. Elektroforesen ble kjørt på 200 V i cirka 40 minutter hvor proteinene vandret fra negativ til positiv elektrode, og ble separert etter molekylstørrelse.

2.6.4 Blotting

Etter elektroforesen ble proteinene overført fra gelen til en nitrocellulose blottingmembran (Hybond™ - ECL™) på TE-70 ECL Semi-Dry Transfer Unit, blottemaskin. Det ble laget en sandwich bestående av 3 filterpapir, membran, gel, og 3 filterpapir. Alt var fuktet i blottebuffer (appendiks 3.3) i 5-10 minutter før blottingen fant sted. Eventuelle bobler i sandwichen ble fjernet med en rulle fuktet i blottebuffer. Blotting ble utført ved 64 mA i 1 time. Etter endt blotting ble standarden på membranen markert med en markeringstusj. Nitrocellulosemembran ble overført med pinsett til en plastboks som inneholdt Ponceau og lå i 2-3 minutter før den ble skylt med destillert vann. Dette ble utført for å se etter om

proteinene fra gelen var blitt overført til nitrocellulosemembranen. Overførte proteiner skulle ses som fargede rosa/røde bånd på nitrocellulosemembranen.

2.6.5 Blokking og inkubering med antistoff

Nitrocellulosemembranen ble blokkert med 20 ml Blotto, en løsning bestående av 5 % tørrmelk og tween-TBS (T-TBS) (appendiks 3.4) i overkant av 1 time på rulle ved romtemperatur. Dette er viktig for å hindre uspesifikk antistoffbinding til nitrocellulosemembran. Etter blokking med Blotto ble membranen overført med pinsett til et 50 ml plastrør og inkubert med 5-10 ml primærantistoffet i kjølerom over natt på Orbital Rotator, 50 sykluser/minutt. De primære antistoffene som ble benyttet var henholdsvis anti-fosfo-Akt (Ser⁴⁷³), anti-total-Akt og anti- α -tublin fortynnet 1:1000 (tabell 2.4). Neste dag ble membranen overført med pinsett til en plastboks og overskudd av ubundet primær antistoff vasket bort i 4×10 minutter med 20 ml T-TBS (appendiks 3.2) på rulle ved romtemperatur. 10 ml av sekundærantistoffet fortynnet 1:3000 (tabell 2.4) i 50/50 T-TBS og Blotto ble tilsatt per membran og inkubert i 60 minutter på rulle ved romtemperatur. Overskudd av ubundet sekundærantistoff ble vasket bort i 4×10 minutter med 20 ml T-TBS på rulle ved romtemperatur.

2.6.6 Deteksjon og kvantifisering

Nitrocellulosemembran ble videre fremkalt med BioRad® Clarity™ Western ECL Substrate. Det bestod av to reagenser, Peroxid Solution og luminol/enhancer solution. Disse ble først blandet i forholdet 1:1 før membranen ble inkubert i 5 minuttter ved romtemperatur. Membranen ble pakket i en transparent film (Lyreco) og plassert i en ChemiDoc™ XRS+. Blottene ble kvantitert ved detektering av kjemiluminescens. Kjemiluminescens skyldes kjemiske reaksjoner hvor enzymet peroksidase katalyserer oksidasjon av luminol og produserer lyssignal (luminescens). Mengden luminescens ble detektert. Andelen fosforylert Akt (fosforylert Akt/total Akt) i myotubene ble beregnet for hver donor ved å dividere lysintensivitet til fosforylert Akt på lysintensivitet til total Akt.

Tabell 2.4: Primær- og sekundærantistoffer til deteksjon av fosforylert Akt, total Akt og total α -tubulin.

| Mål protein | Primærantistoff | Fortynning | Sekundærantistoff | Fortynning |
|------------------------|----------------------------------------|------------|--------------------------------------------|------------|
| Fosforylert Akt/PKB | Rabbit Phospho-Akt (Ser 473) antistoff | 1:1000 | Goat-anti-rabbit IgG, HRP linked antibody | 1:3000 |
| Total Akt | Rabbit Akt antistoff | 1:1000 | Goat-anti-rabbit IgG, HRP linked antibody | 1:3000 |
| Total α -tublin | α -tublin antistoff | 1:1000 | Goat- anti rabbit IgG, HRP linked antibody | 1:3000 |

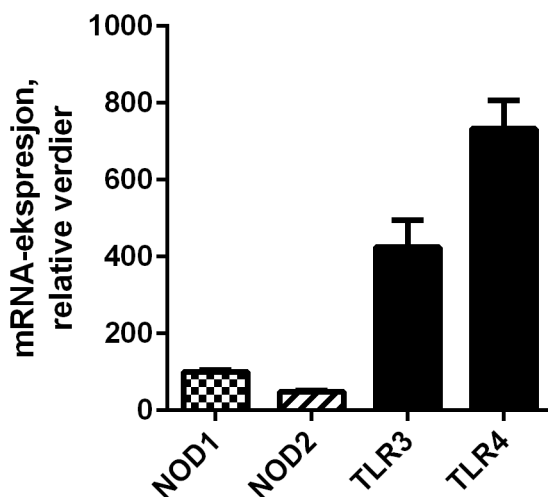
2.7 Statistikk

Det ble benyttet dataprogrammet GraphPad Prism 6 for å utføre alle statistiske analyser i denne oppgaven. Alle dataene er presentert som gjennomsnittsverdi \pm SEM-verdi. I substratoksidasjonsforsøkene ble gjennomsnitt for hver donor beregnet ut i fra 8 paralleller i alle oljesyre- og akutt-forsøkene (glukose + oljesyre). Ved glukoseforsøkene ble gjennomsnittet beregnet ut i fra 4 paralleller for hver donor, både basal og insulinstimulert. I denne oppgaven ble Microsoft[®] Excel[®] for Mac 2011 versjon 14.4.4 brukt til å utføre parede tosidige statistiske metoder (Student's t-test). Det ble brukt signifikansnivå på 5 % ($\alpha = 0,05$), og statistisk signifikans er vist som *, \$, eller # i alle figurer.

3.Resultater

3.1 Påvisning av mRNA-ekspresjon av NOD1-/NOD2-reseptorer i humane skjelettmuskelceller

Forskningsgruppen har tidligere demonstrert mRNA-ekspresjon av NOD1- og NOD2-reseptorer i humane skjelettmuskelceller ved hjelp av microarray-teknikk. Dette er vist i figur 3.1.



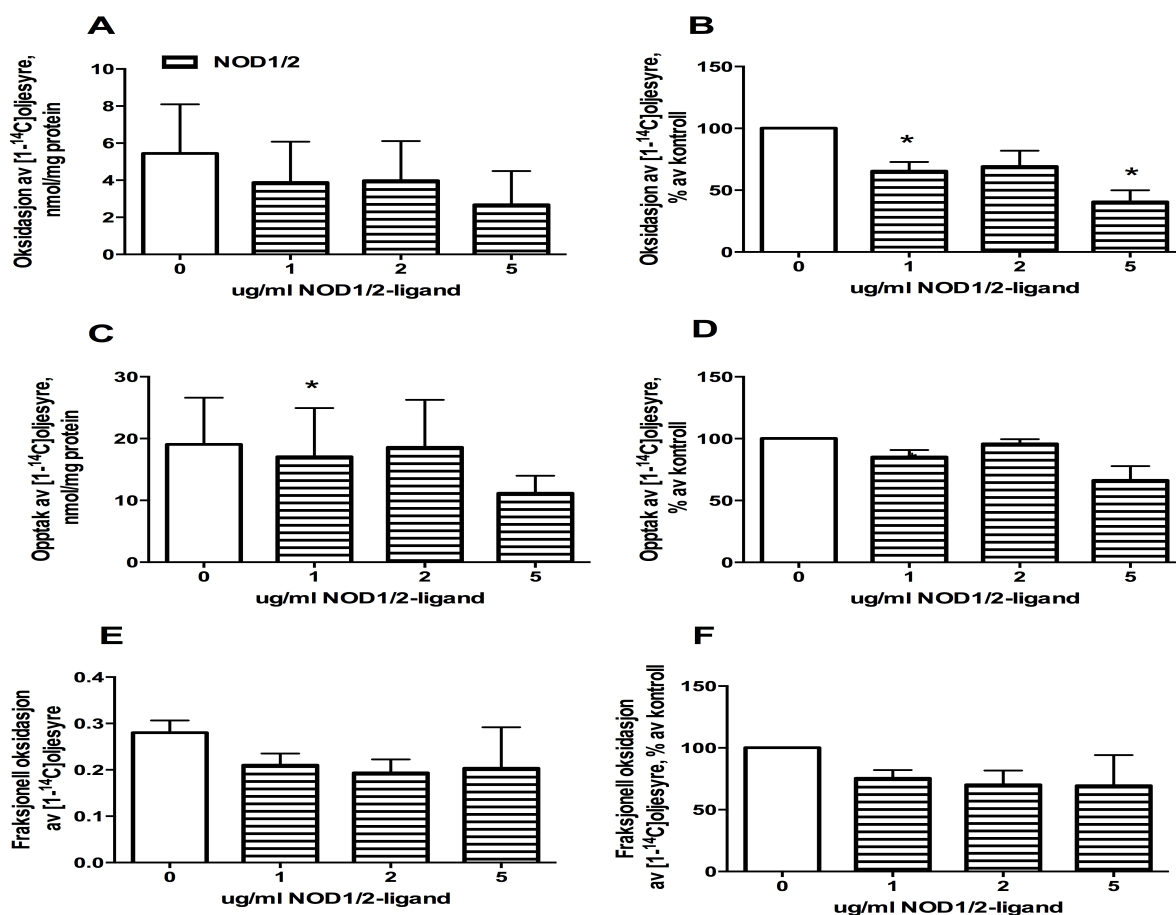
Figur 3.1: Påvisning av mRNA-ekspresjon av NOD1-/NOD2-reseptorer i humane skjelettmuskelceller: mRNA-uttrykk av NOD1-, NOD2-, TLR3- og TLR4 reseptorer basert på rådata fra microarrayforsøk (Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST array) utført av Natasa Nikolic (Gene Expression Omnibus, GSE40789). Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM, n=4, relatert til NOD1-uttrykket.

Det viser at NOD1- og NOD2-reseptorer er tilstede i skjelettmuskelceller, men NOD-reseptorene er forholdsvis lavt uttrykt i forhold til TLR3 og TLR4 (Fig.3.1). LPS er ligand til TLR4, mens dobbelttrådig RNA med noen spesifikke enkelttrådig RNA er ligander til TLR3 [87]. NOD1 er dobbelt så mye uttrykt som NOD2 i skjelettmuskelceller, men er 4 og 7 ganger mindre uttrykt enn henholdsvis TLR3 og TLR4.

3.2 Effekter av NOD1/2-ligand på energimetabolisme

I tidligere studier er det undersøkt effekt av NOD-ligander på ulike celler av både animalsk og human opprinnelse [28, 79, 83], men ikke på humane skjelettmuskelceller. Det ble derfor først undersøkt eventuelle effekter av en uspesifikk NOD1/2-ligand (PGN-ECndi) ved en dose-respons kurve for å se om aktivering av NOD-reseptorer har effekter på glukose- og oljesyremetabolisme i humane skjelettmuskelceller.

Etter differensiering ble myotubene forbehandlet med uspesifikk NOD1/2-ligand i 3 timer ved 1 µg/ml, 2 µg/ml og 5 µg/ml før substratoksidasjonsforsøk i 4 timer (se avsnitt 2.5.1) med enten oljesyre eller glukose som radioaktivt substrat. Resultatet for oljesyremetabolismen er vist i figur 3.2 (A-F).

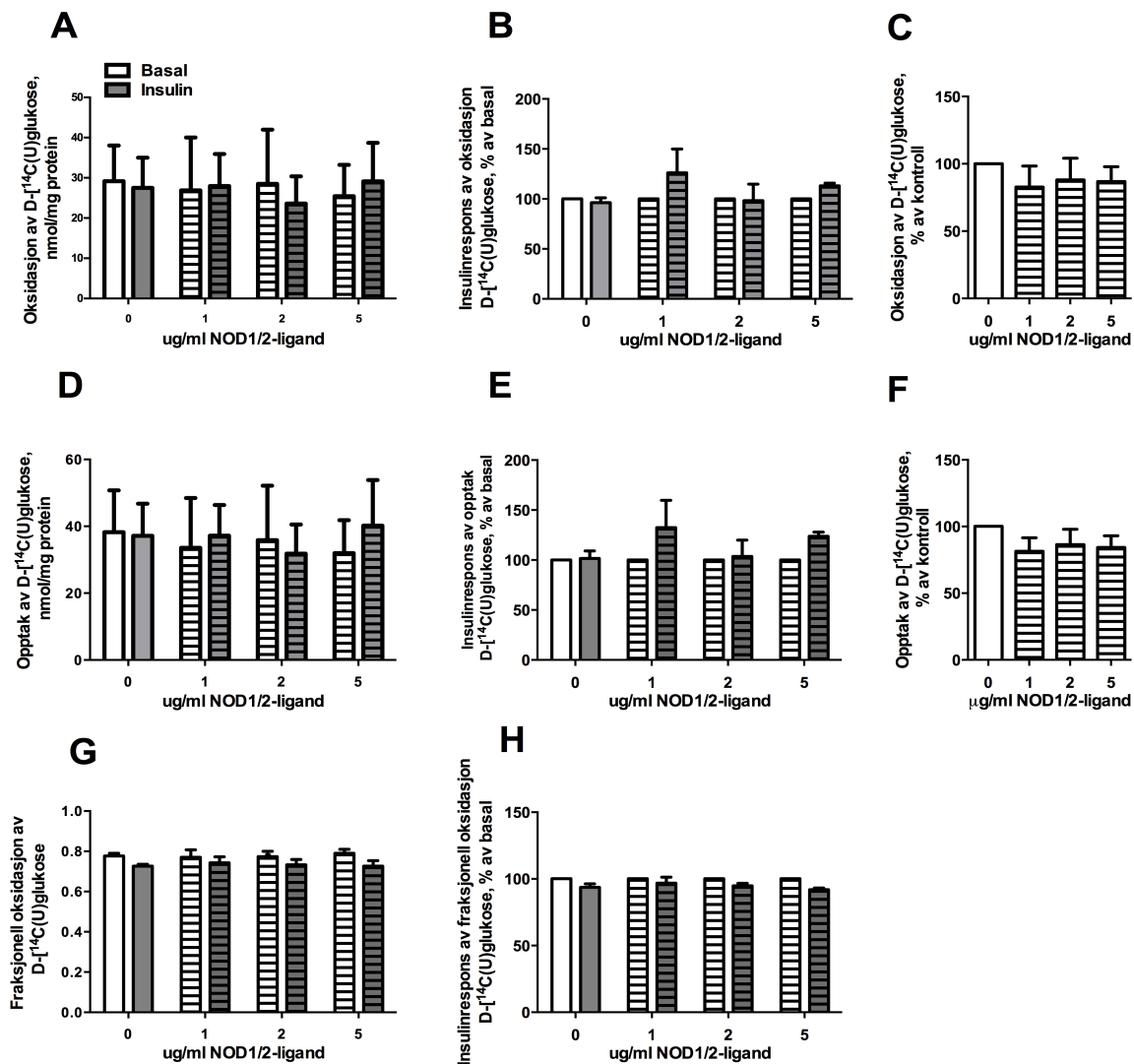


Figur 3.2: Effekter av NOD1/2-ligand på oljesyremetabolisme som dose-respons: Myotuber ble forbehandlet med NOD1/2-ligand (PGN-ECndi) i 3 timer ved 1 µg/ml, 2 µg/ml og 5 µg/ml i inkubator. Etter forbehandling og vasking av NOD1/2-ligand ble myotuber videre inkubert i fire timer med 100 µM [^{14}C]oljesyre. A,B: Oksidasjon (CO_2) relatert til kontroll. C,D: Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) relatert til kontroll. E,F: Fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 3 uavhengige forsøk (n=3).

* $p \leq 0,05$ vs. kontroll (paret tosidig t-test).

Figur 3.2 viser en tydelig reduksjon av oljesyreoksidasjon ved NOD1/2-stimulering. Dette tilsvarer en signifikant reduksjon på 35% ved 1µg/ml og 60% ved 5µg/ml i forhold til kontrollen (Fig.3.2 A-B). Dessuten var det en liten reduksjon av oljesyreopptaket, signifikant reduksjon ved 1µg/ml som tilsvarer en reduksjon på 15%, men imidlertid ikke ved 5µg/ml (Fig 3.2 C-D). Andel oljesyreoksidasjon i forhold til andel oljesyreopptak som ble tatt opp av cellene, det vil si fraksjonell oksidasjon, var ikke signifikant endret (Fig3.2 E-F).

Effekter av NOD1/2-stimulering på glukosemetabolisme er vist i figur 3.3 (A-H).



Figur 3.3: Effekter av NOD1/2-ligand på glukosemetabolisme som dose-respons: Myotuber ble forbehandlet med NOD1/2 ligand (PGN-ECndi) i 3 timer ved 1µg/ml, 2µg/ml og 5µg/ml i inkubator. Etter forbehandling og vasking av NOD1/2-ligand ble myotuber videre inkubert i fire timer med 200µM [¹⁴C]glukose. A,B,C: Oksidasjon (CO₂). D,E,F: Opptak (CO₂ + CA). G,H: Fraksjonell oksidasjon. A,D,G: Oksidasjon, opptak, fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. B,E,H: Insulinrespons i % av uten insulin. C,F: Effekt av NOD1/2-ligand i % av kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt ± SEM fra 3 uavhengige forsøk (n=3).

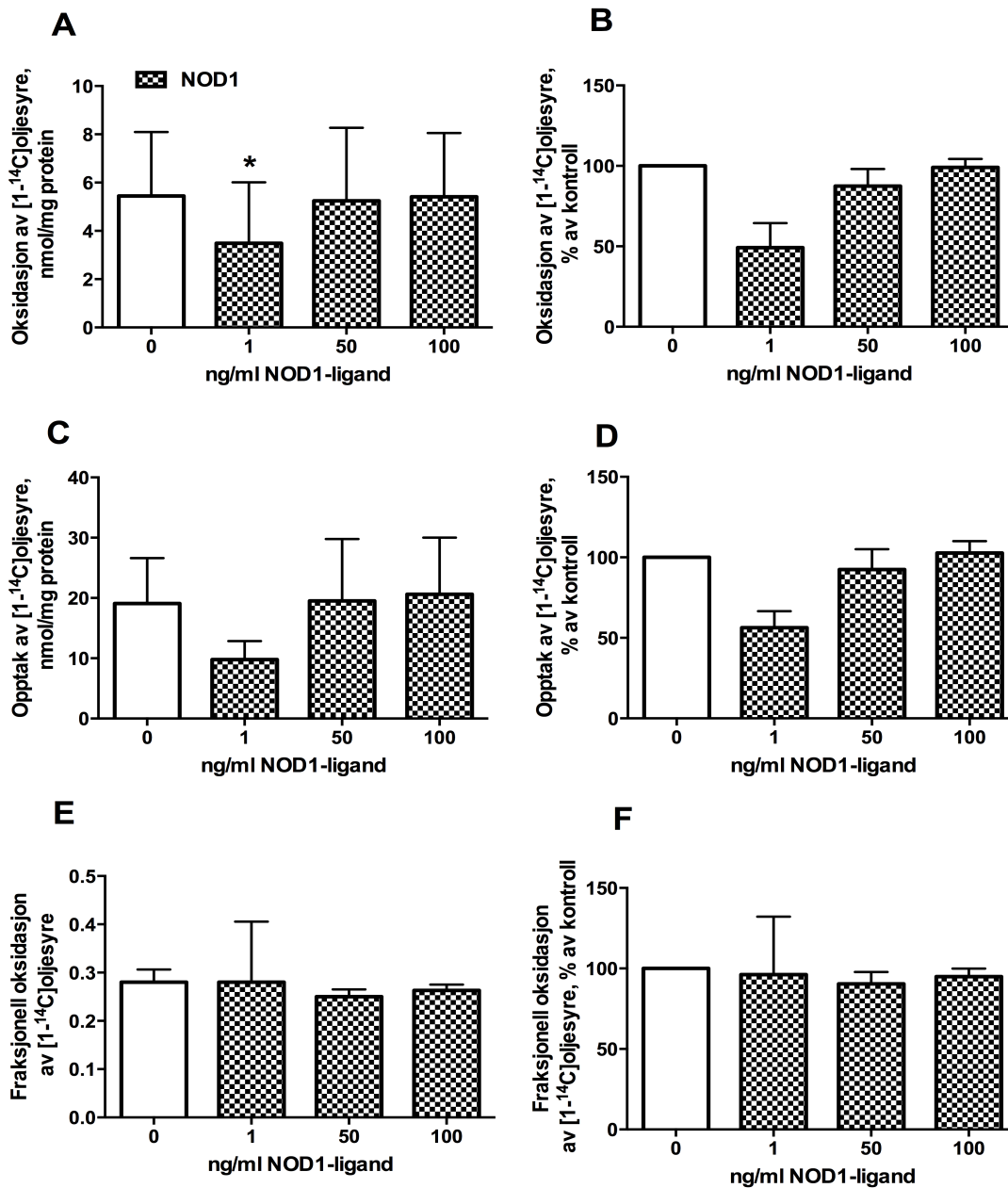
På basal glukosemetabolisme var det ingen signifikante effekter av NOD1/2-ligand (Fig 3.3). Glukosemetabolismen ble også undersøkt i nærvær av insulin, for å studere effekter av NOD1/2-stimulering på insulinresponsen (Fig3.3 B,E,H). I disse forsøkene var det ingen tydelig insulinrespons, og det var heller ikke effekt av NOD1/2-stimulering. Fraksjonell glukoseoksidasjon (Fig3.3 G,H) gav ingen endring ved NOD1/2-stimulering i forhold til kontrollen.

3.3 Effekter av NOD1-ligand på energimetabolisme

3.3.1 Oljesyremetabolisme

Utfra effektene av NOD1/2- liganden på oljesyremetabolisme, ønsket vi videre å undersøke effekter av spesifikke NOD-ligander, C12-iE-DAP (NOD1) og L18-MDP (NOD2) både på oljesyremetabolisme og glukosemetabolisme.

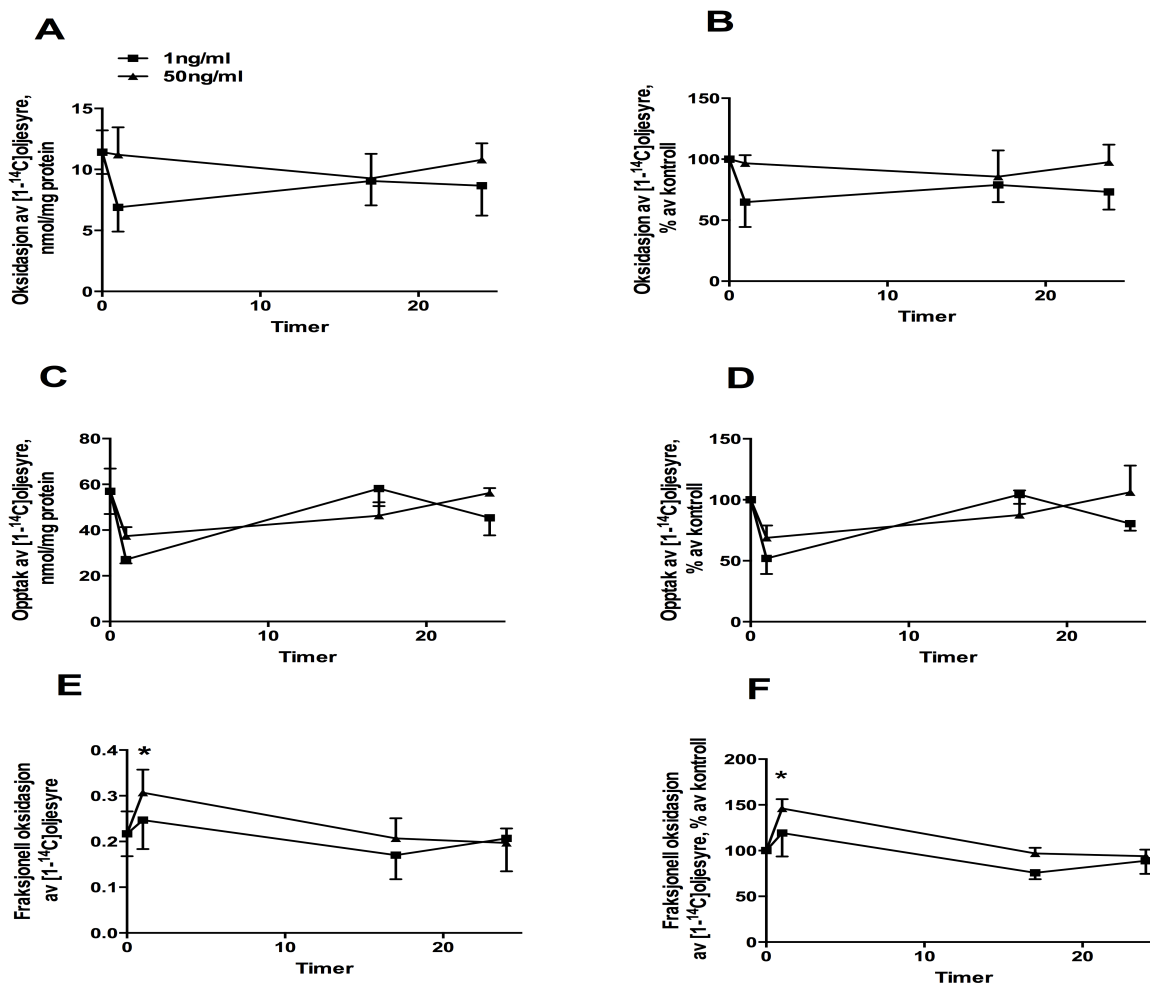
Først ble det undersøkt effekter av spesifikk NOD1-ligand på oljesyremetabolisme ved en dose-respons kurve. Myotubene ble forbehandlet med C12-iE-DAP NOD1-ligand i 3 timer ved 1ng/ml, 50ng/ml og 100ng/ml før substratoksidasjonsforsøket med oljesyre som radioaktivt substrat. Resultatet er vist i figur 3.4 (A-F).



Figur 3.4: Effekter av NOD1-ligand på oljesyremetabolisme som dose-respons: Myotuber ble forbehandlet med NOD1-ligand (C12-iE-DAP) i 3 timer ved 1ng/ml, 50ng/ml og 100ng/ml i inkubator. Etter forbehandling og vasking av NOD1-ligand ble myotuber videre inkubert i fire timer med 100 μ M [14 C]oljesyre. A,B: Oksidasjon (CO_2) relatert til kontroll. C,D: Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) relatert til kontroll. E,F: Fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 3 uavhengige forsøk (n=3). * $p \leq 0,05$ vs. kontroll (paret tosidig t-test).

Figur 3.4 viser en signifikant redusert oljesyreoksidasjon ved 1ng/ml av NOD1-ligand som tilsvarer i underkant av 50% av sin respektive kontroll. Det var tilsynelatende en tilsvarende reduksjon av oljesyreopptak, men det var imidlertid ingen signifikante forskjeller på oljesyreopptak og fraksjonell oljesyreoksidasjon etter NOD1-stimulering.

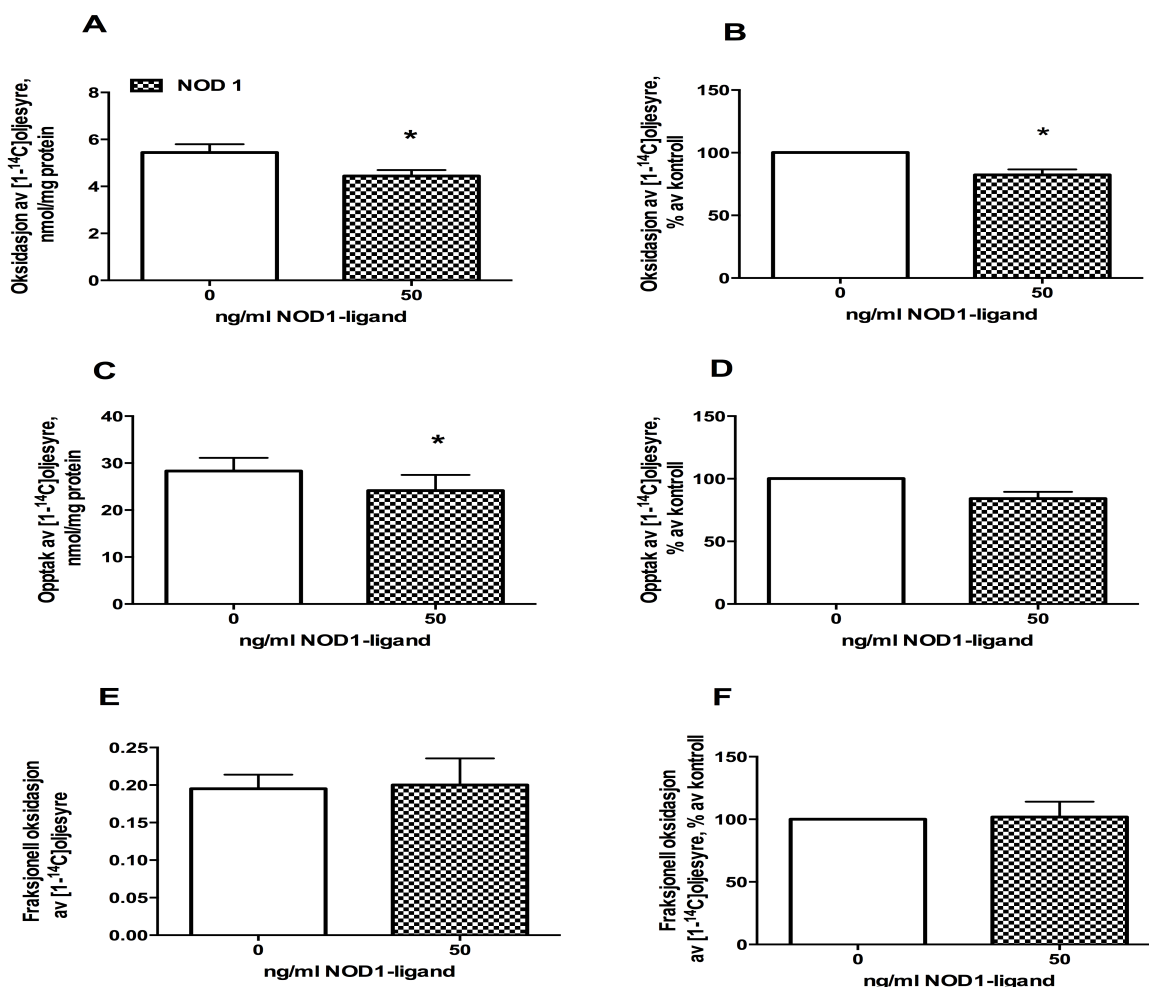
I og med at det ble observert redusert oljesyreoksidasjon etter 3 timers forbehandling med NOD1-ligand, ble oljesyremetabolisme videre undersøkt ved en tidskurve. Myotubene ble forbehandlet med NOD1-ligand i 1t, 17t, og 24t ved 1ng/ml og 50ng/ml før substratoksidasjonsforsøk. Resultatet er vist i figur 3.5 (A-F).



Figur 3.5: Effekter av NOD1-ligand på oljesyremetabolisme ved tidskurve: Myotuber ble forbehandlet med NOD1-ligand (C12-iE-DAP) i 1t, 17t og 24t ved 1ng/ml og 50ng/ml i inkubator. Etter forbehandling ble NOD1-ligand vasket bort og myotuber ble videre inkubert i fire timer med $100\mu\text{M}[^{14}\text{C}]$ oljesyre. A,B: Oksidasjon (CO_2) relatert til kontroll. C,D: Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) relatert til kontroll. E,F: Fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 3 uavhengige forsøk ($n=3$). * $p \leq 0,05$ vs. kontroll (paret tosidig t-test).

Figur 3.5 viser ingen signifikante effekter av NOD1-ligand på oljesyreoksidasjon (Fig3.5 A-B). En signifikant reduksjon på 51% for celleassosiert oljesyre (CA) ble vist ved 1 timers forbehandling av NOD1-ligand ved 1ng/ml (data ikke vist), men imidlertid ingen signifikant reduksjon ($p=0,06$) på totalt oljesyreopptak ($\text{CA} + \text{CO}_2$) (Fig.3.5 C). Det var i tillegg en økt fraksjonell oljesyreoksidasjon ved 50ng/ml av NOD1-ligand ved 1timers forbehandling (Fig. 3.5 E).

Siden det viste seg at NOD1-ligand (1ng/ml) hadde effekter på oljesyremetabolisme ved kort tids (1-3 timers) forbehandling ønsket vi videre å få undersøkt om effekten av NOD1-ligand kommer ved akutt eksponering under substratoksidasjonsforsøket. Myotubene ble ikke forbehandlet med NOD1-ligand, men i stedet ble det tilsatt 50ng/ml av NOD1-ligand under substratoksidasjonsforsøket i 4 timer. Resultatet er vist i figur 3.6 (A-F).



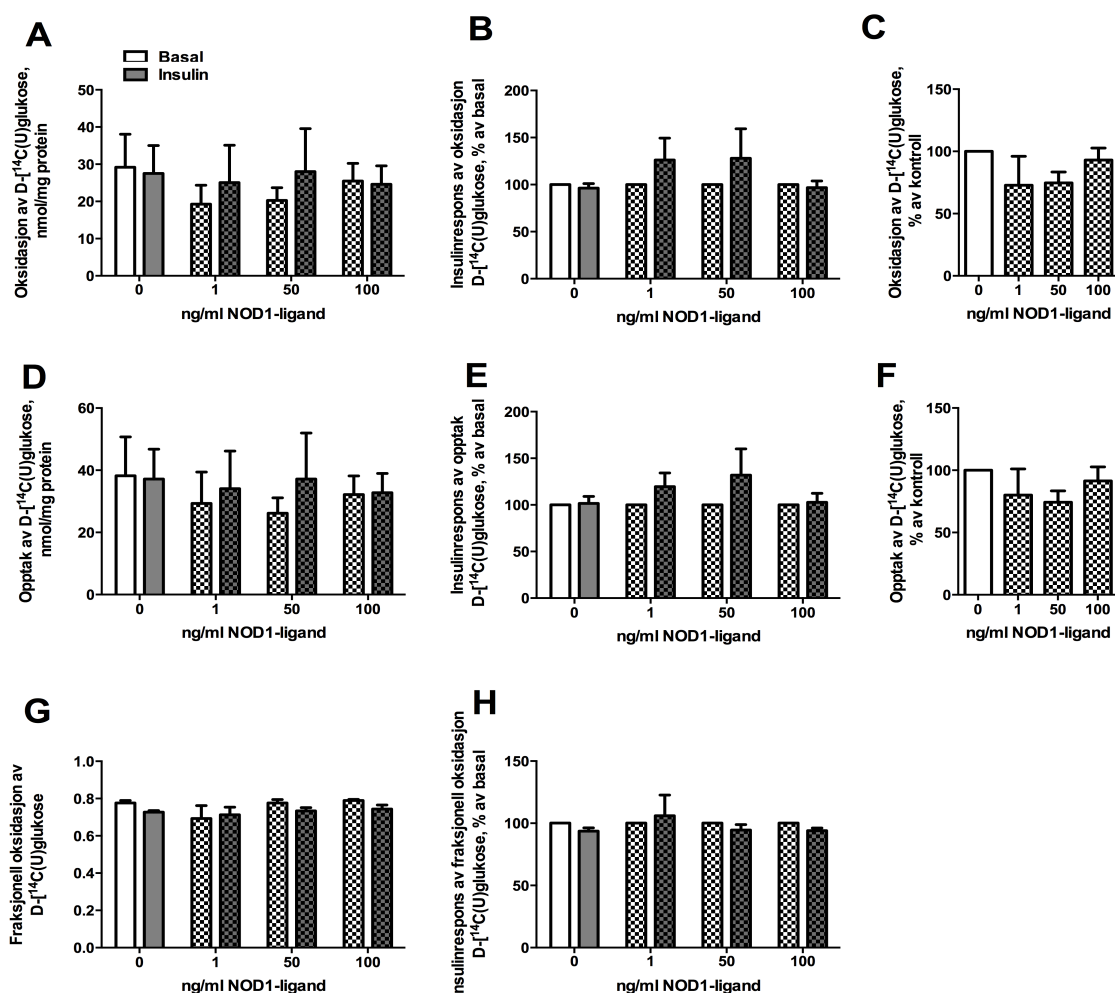
Figur 3.6: Effekter av akutt eksponering med NOD1-ligand på oljesyremetabolisme: Myotuber ble akutt eksponert for 50ng/ml av NOD1-ligand (C12-iE-DAP) med 100 μM [^{14}C]oljesyre og CO_2 ble trappet i fire timer. A,B: Oksidasjon (CO_2) relatert til kontroll. C,D: Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) relatert til kontroll. E,F: Fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 4 uavhengige forsøk (n=4). * $p \leq 0,05$ vs. kontroll (paret tosidig t-test).

Figur 3.6 viser en signifikant NOD1-ligand-indusert reduksjon både av oljesyreoksidasjon (Fig.3.6 A-B) og oljesyreopptak (Fig.3.6 C-D). Oljesyreoksidasjonen ble redusert til 82% mens oljesyreopptak ble redusert til 84% av sin respektive kontroll (Fig.3.6 B,D). Fraksjonell oljesyreoksidasjon var ikke signifikant endret.

3.3.2 Glukosemetabolisme

Uspesifikk NOD1/2-ligand viste ikke noen effekter på glukosemetabolismen. I litteraturen er det vist at NOD1-ligand svekket insulinsignaler og reduserte insulinstimulert glukoseopptak i humane fettceller [82, 83]. Det var derfor ønskelig å undersøke effekter av C12-iE-DAP NOD1-ligand på glukosemetabolisme i humane myotuber.

Ved en dose-respons kurve ble differensierte myotuber forbehandlet med en spesifikk NOD1-ligand i 3 timer ved 1ng/ml, 50ng/ml og 100ng/ml før substratoksidasjonsforsøk med glukose som radioaktivt substrat. Resultatet er vist i figur 3.7 (A-H).

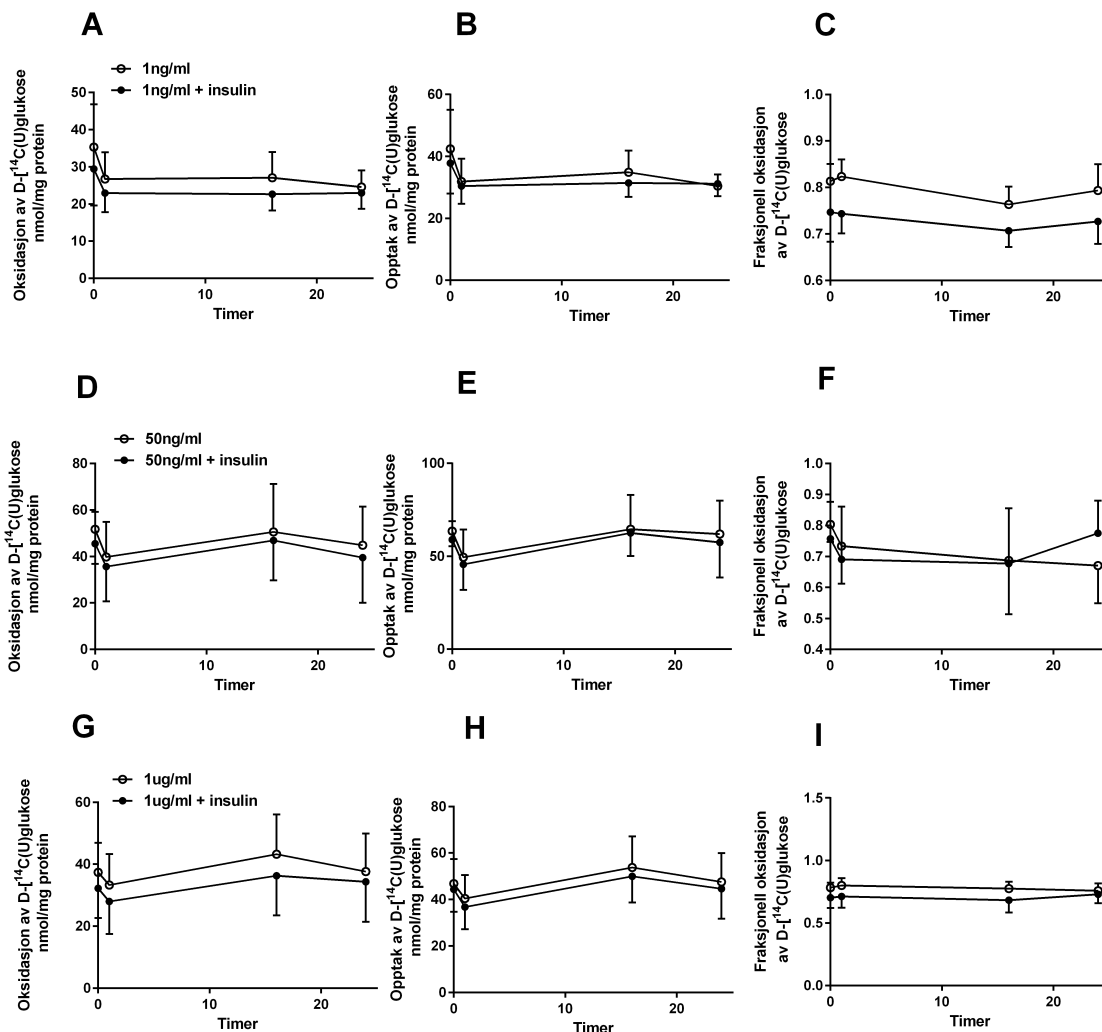


Figur 3.7: Effekter av NOD1-ligand på glukosemetabolisme som dose-respons: Myotuber ble forbehandlet med NOD1-ligand (C12-iE-DAP) i 3 timer ved 1ng/ml, 50ng/ml og 100ng/ml i inkubator. Etter forbehandling og vasking av NOD-ligand ble myotuber videre inkubert i fire timer med 200μM [¹⁴C]glukose. Glukosemetabolisme ble undersøkt i nærvær av 100 nM insulin. A,B,C: Oksidasjon (CO₂). D,E,F: Opptak (CO₂ +CA). G,H: Fraksjonell oksidasjon. A,D,G: Oksidasjon, opptak, fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. B,E,H: Insulinrespons i % av uten insulin. C,F: Effekt av NOD1-ligand i % av kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt ±SEM fra 3 uavhengige forsøk (n=3).

Det så ut som NOD1-ligand kunne vise tendenser til redusert basalt glukoseopptak og glukoseoksidasjon ved lavere konsentrasjoner (1ng/ml og 50ng/ml), men det var ingen signifikante effekter på basal glukosemetabolisme (Fig.3.7 A,C,D,F).

Glukosemetabolismen ble også undersøkt i nærvær av insulin, for å studere mulige effekter av NOD1-stimulering på insulinresponsen (Fig3.7 B,E,H). I disse forsøkene var det ingen tydelig insulinrespons, og det var heller ingen signifikant effekt av NOD1-stimulering. Fraksjonell glukoseoksidasjon etter NOD1-ligand-stimulering viste ingen endring i forhold til kontrollen (Fig 3.7 G).

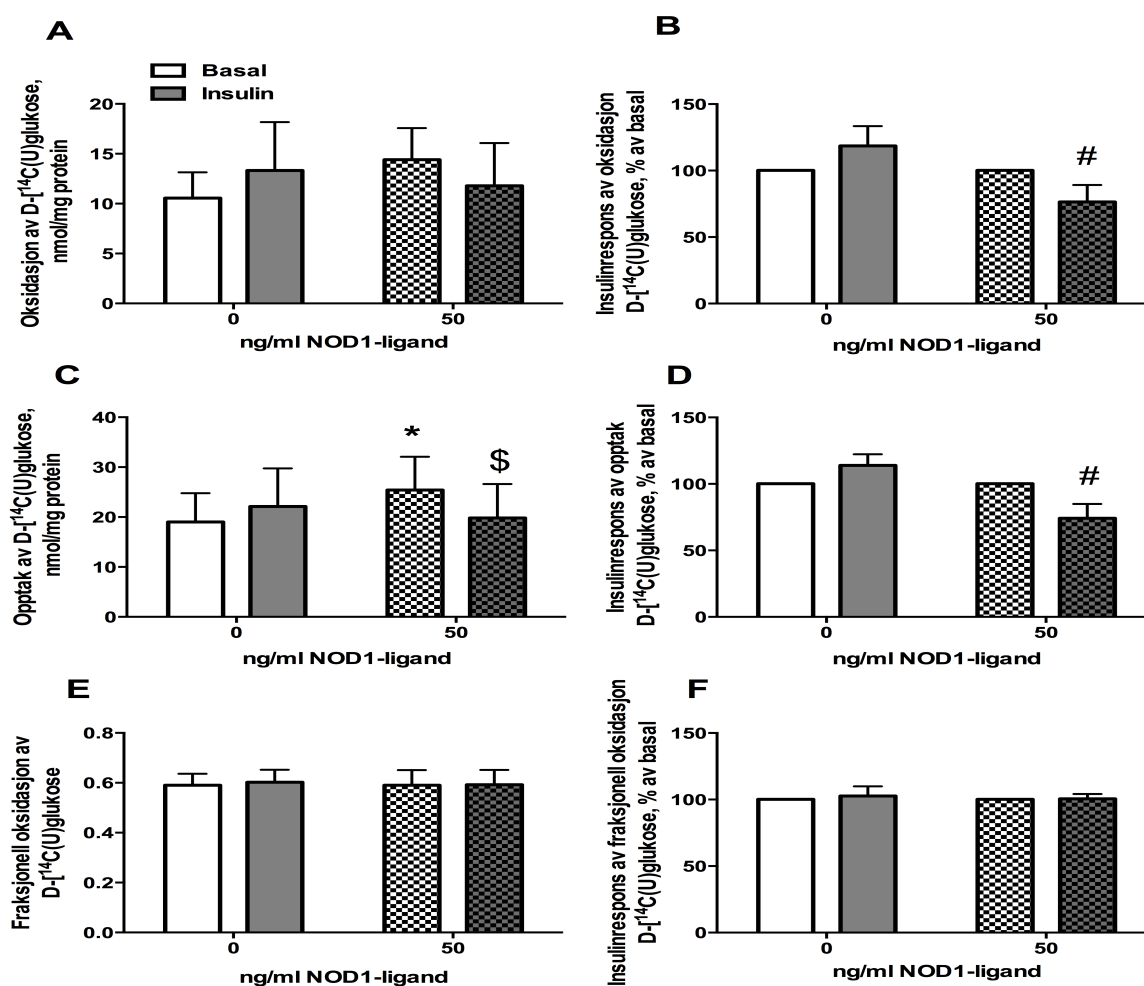
Ved en tidsskurve ble NOD1-effekter på glukosemetabolisme videre undersøkt. I disse forsøkene ble myotubene forbehandlet med ulike konsentrasjoner (1ng/ml, 50ng/ml, 1µg/ml) i 1t, 16t, og 24t før substratoksidasjonsforsøk. 1µg/ml ble valgt for å se om effekter av NOD1-ligand ble tydeligere ved å utsette myotubene for en høyere konsentrasjon. Resultatet er vist i figur 3.8 (A-I).



Figur 3.8: Effekter av NOD1-ligand på glukosemetabolisme ved tidsskurve: Myotuber ble forbehandlet med NOD1-ligand (C12-iE-DAP) i 1t, 16t og 24t ved 1ng/ml, 50ng/ml og 1µg/ml i inkubator. Etter forbehandling ble NOD1-ligand vasket bort og myotuber ble videre inkubert i fire timer med 200µM[¹⁴C]glukose. Glukosemetabolisme ble undersøkt i nærvær av 100 nM insulin. A,D,G: Oksidasjon (CO₂) relatert til kontroll. B,E,H: Opptak (CO₂ +CA) relatert til kontroll. C,F,I: Fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt ±SEM fra 3 uavhengige forsøk (n=3).

Figur 3.8 viser ingen signifikante effekter av NOD1-ligand-stimulering på glukosemetabolisme. I disse forsøkene var det heller ingen tydelige insulinresponser.

For å undersøke effekter av akutt eksponering av NOD1-ligand ble det tilsatt 50ng/ml av NOD1-ligand under substratoksidasjonsforsøket. Resultatet er vist i figur 3.9 (A-F).



Figur 3.9: Effekter av akutt eksponering med NOD1-ligand på glukosemetabolisme: Myotuber ble akutt eksponert for 50ng/ml av NOD1-ligand (C12-iE-DAP) med 200μM [¹⁴C]glukose og CO₂ ble trappet i fire timer. Glukosemetabolisme ble undersøkt i nærvær av 100nM insulin. A,B: Oksidasjon (CO₂). C,D: Opptak (CO₂ +CA). E,F: Fraksjonell oksidasjon. A,C,E: oksidasjon, opptak, fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. B,D,F: Insulinrespons i % av uten insulin. Dataene er presentert som gjennomsnitt ±SEM fra 4 uavhengige forsøk (n=4). *p≤0,05 vs. kontroll uten insulin (paret tosidig t-test). #p≤0,05 vs. kontroll med insulin (paret tosidig t-test). \$p≤0,05 vs. NOD1-ligand uten insulin (paret tosidig t-test).

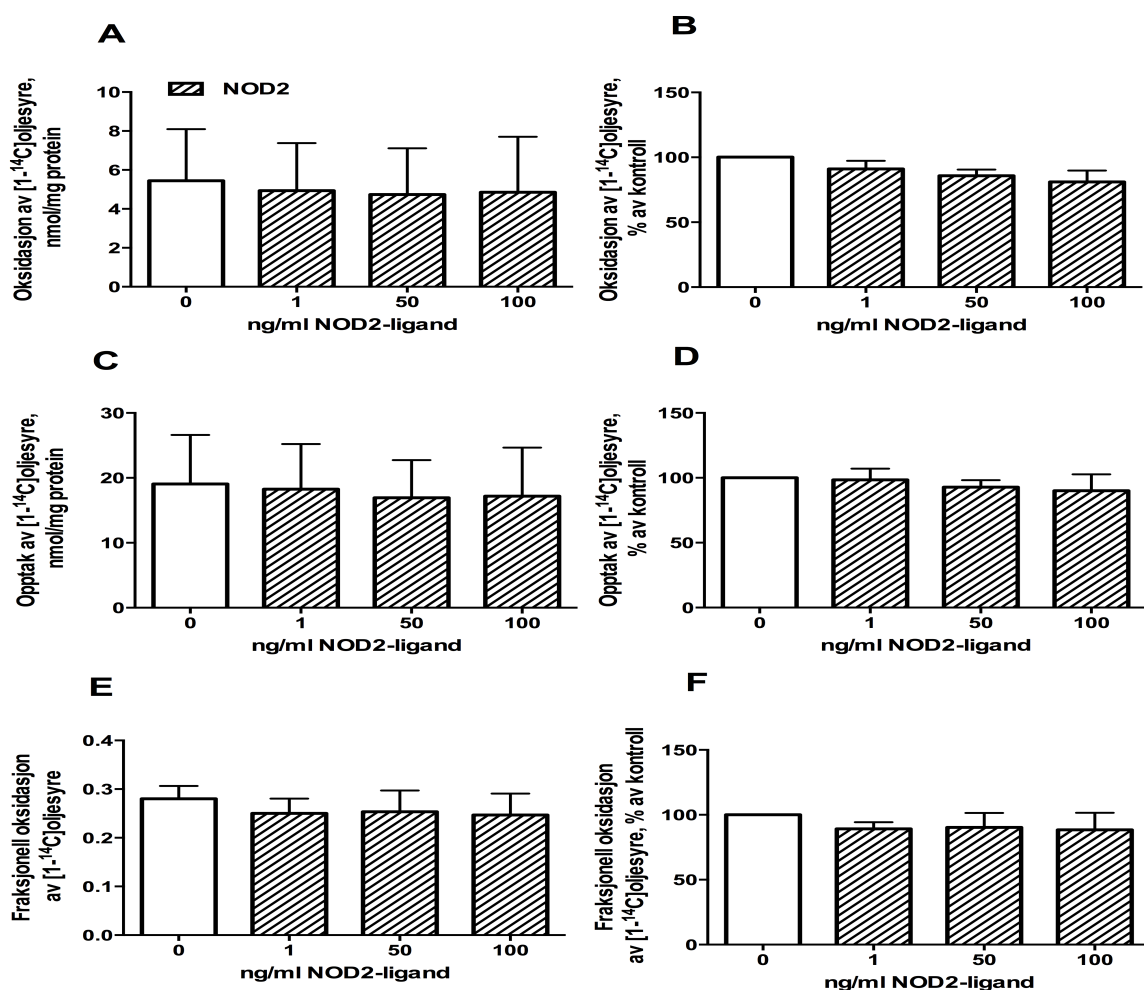
Akutt eksponering med NOD-1 ligand (50ng/ml) ga effekter både på basal og insulinstimulert glukosemetabolisme. En signifikant økning i basalt glukoseopptak i forhold til kontrollen ble funnet (Fig.3.9 C). I nærvær av NOD1-ligand ble insulinstimulert glukoseopptak redusert (Fig.3.9 C). Insulinrespons både på glukoseoksidasjon og glukoseopptak ble også i nærvær av NOD1-ligand tydelig redusert med 25% relatert til kontrollen (Fig3.9 B,D).

3.4 Effekter av NOD2-ligand på energimetabolisme

3.4.1 Oljesyremetabolisme

Ut fra effektene av NOD1/2- og spesifikke NOD1-ligand på oljesyremetabolisme, ønsket vi å se effekter av en spesifikk NOD2-ligand (L18-MDP) på oljesyremetabolismen.

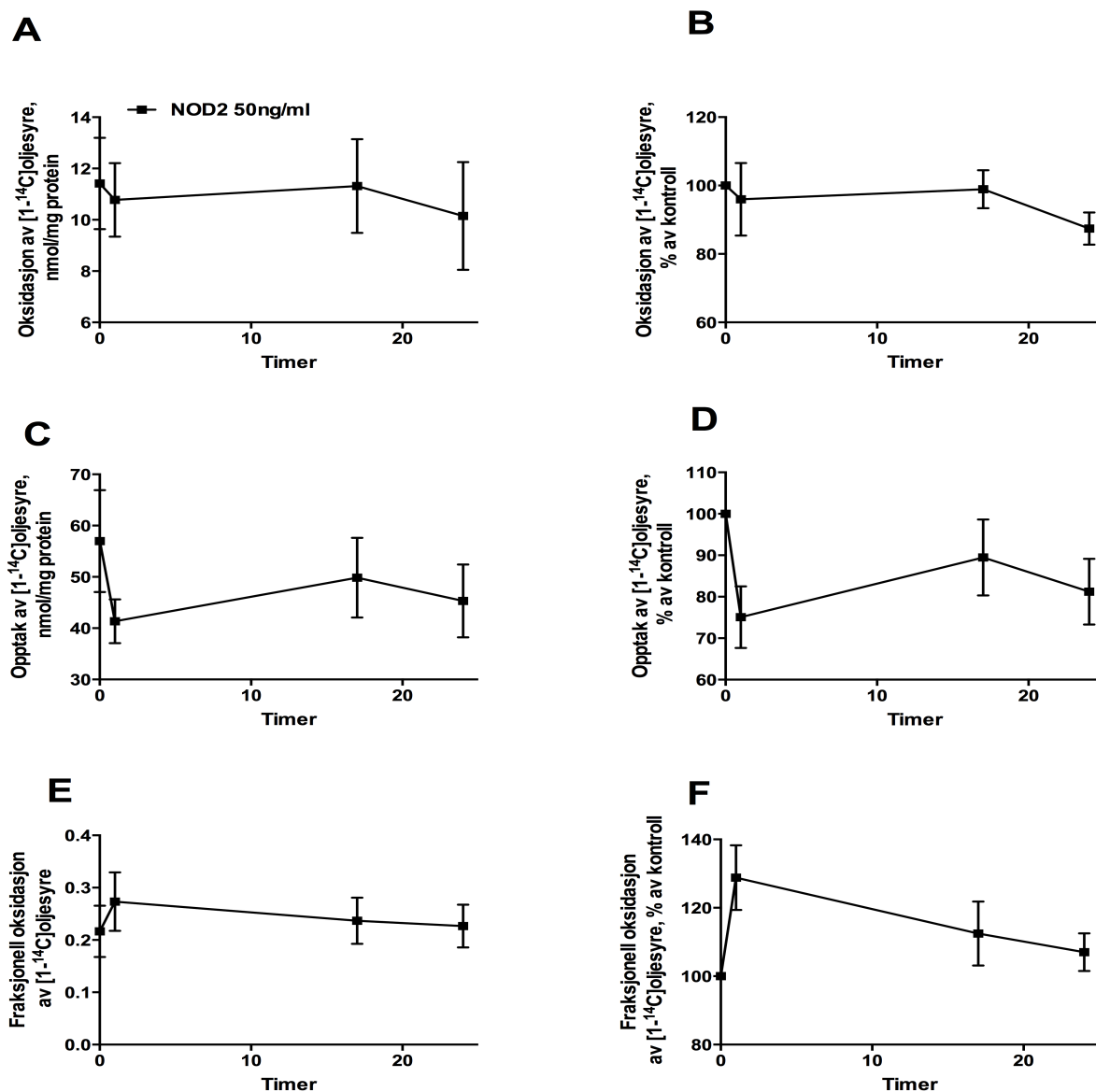
Det ble på en tilsvarende måte som NOD1-ligand først undersøkt effekter av NOD2-ligand ved en dose-respons kurve. Myotubene ble forbehandlet med NOD2-ligand i 3 timer ved 1ng/ml, 50ng/ml og 100ng/ml før substratoksidasjonsforsøk med oljesyre som radioaktivt substrat. Resultatet er vist i figur 3.10 (A-F).



Figur 3.10: Effekter av NOD2-ligand på oljesyremetabolisme som dose-respons: Myotuber ble forbehandlet med NOD2-ligand (L18-MDP) i 3 timer ved 1ng/ml, 50ng/ml og 100ng/ml i inkubator. Etter forbehandling og vasking av NOD2-ligand ble myotuber videre inkubert i fire timer med $100\mu\text{M}[^{14}\text{C}]$ oljesyre. A,B: Oksidasjon (CO_2) relatert til kontroll. C,D: Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) relatert til kontroll. E,F: Fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 3 uavhengige forsøk ($n=3$).

Figur 3.10 viser ingen signifikante effekter av NOD2-stimulering på oljesyremetabolisme.

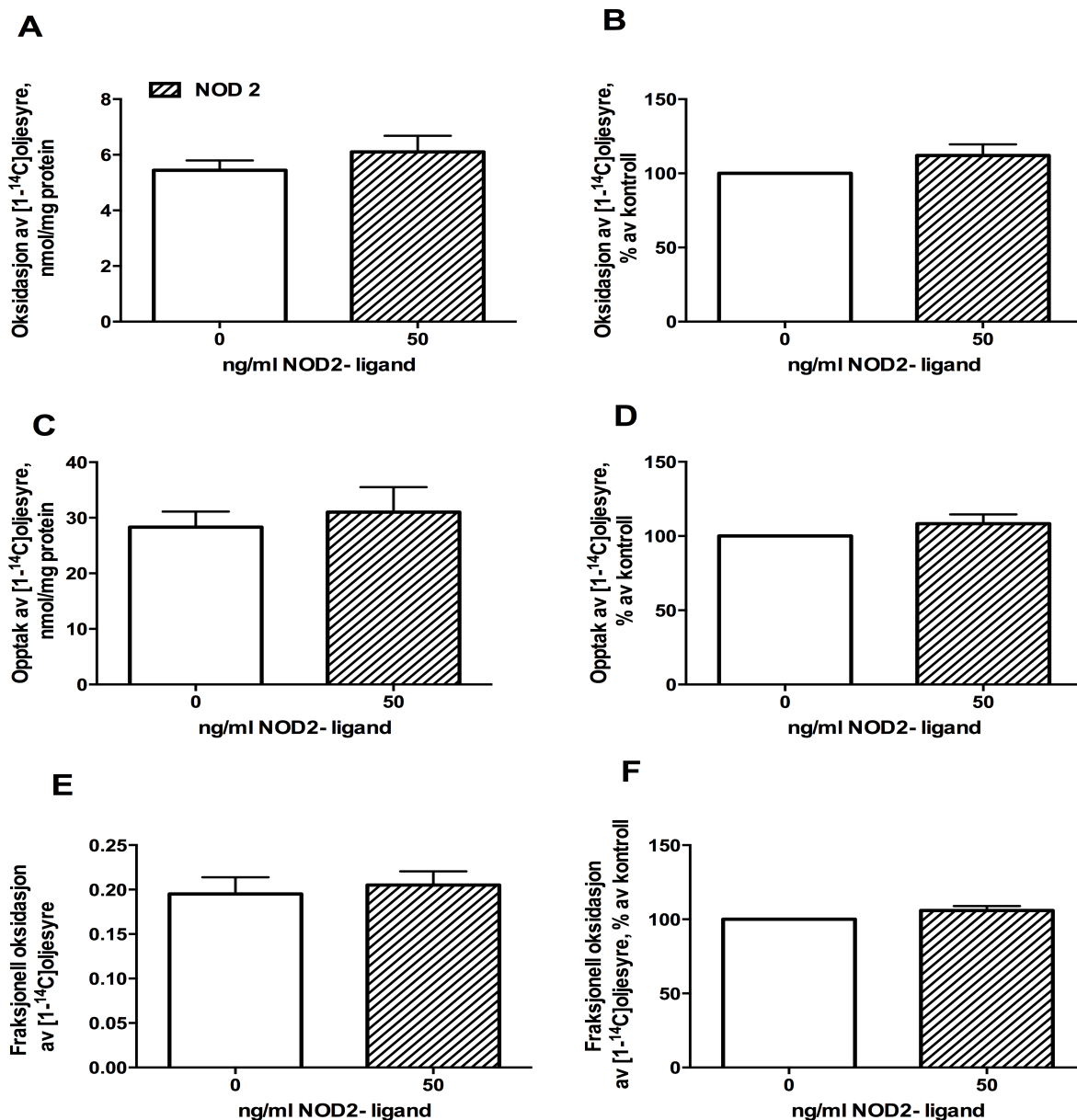
Ved en tidskurve ble NOD2-effekter på oljesyremetabolisme videre undersøkt. Differensierte myotuber ble forbehandlet med NOD2-ligand i 1t, 17t, og 24t ved 50ng/ml før substratoksidasjonsforsøket. Resultatet er vist i figur 3.11 (A-F).



Figur 3.11: Effekter av NOD2-ligand på oljesyremetabolisme ved tidskurve: Myotuber ble forbehandlet med NOD2-ligand (L18-MDP) i 1t, 17t og 24t ved 50ng/ml i inkubator. Etter forbehandling ble NOD2-ligand vasket bort og myotuber ble videre inkubert i fire timer med 100 μM [^{14}C]oljesyre. A,B: Oksidasjon (CO_2) relatert til kontroll. C,D: Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) relatert til kontroll. E,F: Fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 3 uavhengige forsøk (n=3).

Figur 3.11 (A-F) viser ingen signifikante effekter av NOD2-stimulering på oljesyremetabolisme.

Det var videre ønsket å se eventuelle effekter av akutt eksponering med NOD2-ligand på oljesyremetabolisme. Det ble tilsatt 50ng/ml av NOD2-ligand under substratoksidasjonsforsøket. Resultatet er vist i figur 3.12 (A-F).



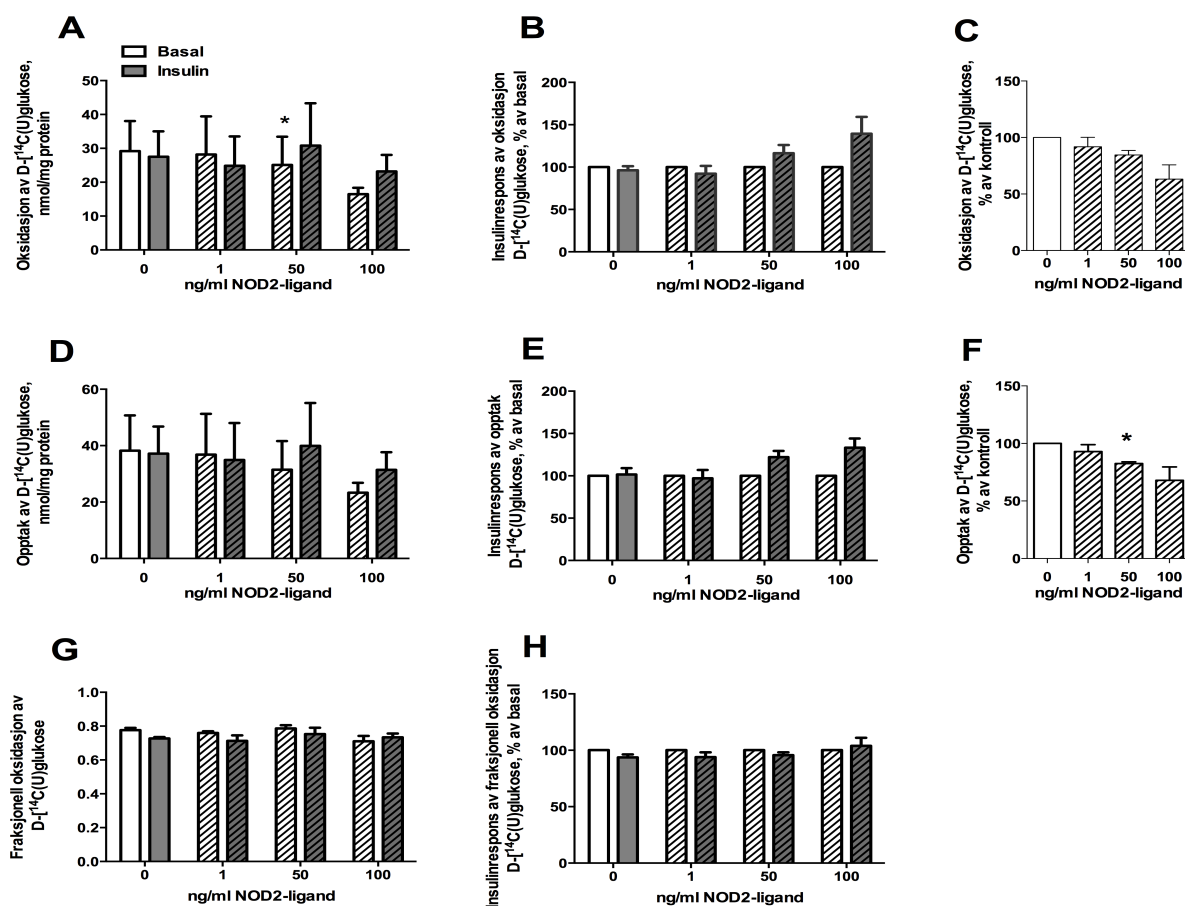
Figur 3.12: Effekter av akutt eksponering med NOD2-ligand på oljesyremetabolisme: Myotuber ble akutt eksponert for 50ng/ml av NOD2-ligand (L18-MDP) med $100\mu\text{M}$ [^{14}C]oljesyre og CO_2 ble trappet i fire timer. A,B: Oksidasjon (CO_2) relatert til kontroll. C,D: Opptak ($\text{CO}_2 + \text{CA}$) relatert til kontroll. E,F: Fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 4 uavhengige forsøk ($n=4$).

Figur 3.12 (A-F) viser ingen signifikante effekter av NOD2-stimulering på oljesyremetabolisme

3.4.2 Glukosemetabolisme

På glukosemetabolisme hadde NOD1-ligand (50ng/ml) tydelige effekter ved akutt eksponering under substratoksidasjonsforsøket. Det er vist effekt av MDP NOD2-ligand på L6-muskelceller på insulinstimulert glukosemetabolisme [27]. Dette økte interessen for å undersøke effekter av L18-MDP NOD2-ligand på glukosemetabolisme på en tilsvarende måte som NOD1-ligand.

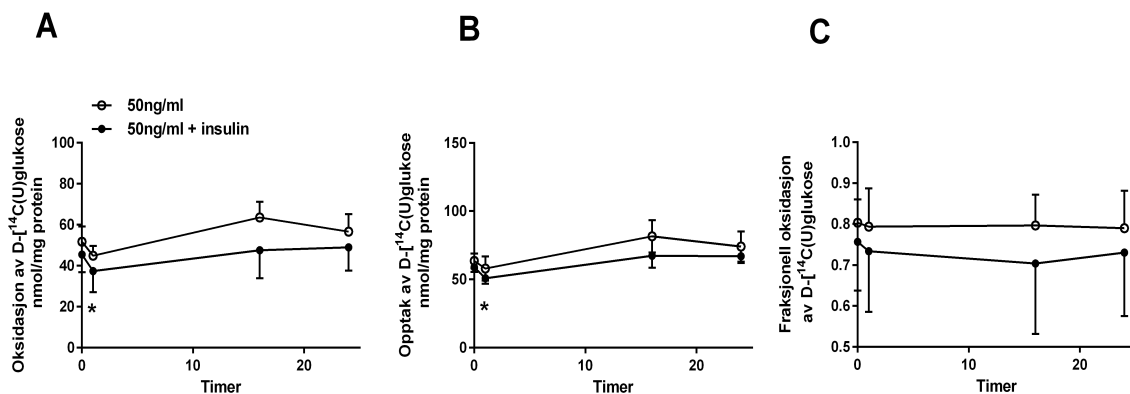
Ved en dose-respons kurve ble differensierte myotuber forbehandlet med en spesifikk NOD2-ligand (L18-MDP) i 3 timer ved 1ng/ml, 50ng/ml og 100ng/ml før substratoksidasjonsforsøket med glukose som radioaktivt substrat. Resultatet er vist i figur 3.13 (A-H).



Figur 3.13: Effekter av NOD2-ligand på glukosemetabolisme som dose-respons: Myotuber ble forbehandlet med NOD2-ligand (L18-MDP) i 3 timer ved 1ng/ml, 50ng/ml og 100ng/ml i inkubator. Etter forbehandling og vasking av NOD2-ligand ble myotuber videre inkubert i fire timer med 200μM [¹⁴C]glukose. Glukosemetabolisme ble undersøkt i nærvær av 100 nM insulin. A,B,C: Oksidasjon (CO₂). D,E,F: Opptak (CO₂ + CA). G,H: Fraksjonell oksidasjon. A,D,G: Oksidasjon, opptak, fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. B,E,H: Insulinrespons i % av uten insulin. C,F: Effekt av NOD2-ligand i % av kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt ±SEM fra 3 uavhengige forsøk (n=3). * p≤0,05 vs. kontroll uten insulin (paret tosidig t-test).

Figur 3.13 (A-F)) viser at det var effekter av NOD2-ligand ved 50 ng/ml både på basal glukoseoksidasjon og glukoseopptak. Basal glukoseoksidasjon var signifikant redusert ($p=0,036$) med ca.15% (Fig.3.13 A,C) mens basalt glukoseopptak var signifikant redusert ($p=0,006$) med ca.17% i forhold til sin respektive kontroll (Fig.3.13F). Glukosemetabolismen ble også undersøkt i nærvær av insulin, for å studere effekter av NOD2-stimulering på insulinresponsen (Fig.3.13 B,E,H). I disse forsøkene var det ingen tydelige insulinresponsen, og det var heller ingen signifikant effekt av NOD2-stimulering.

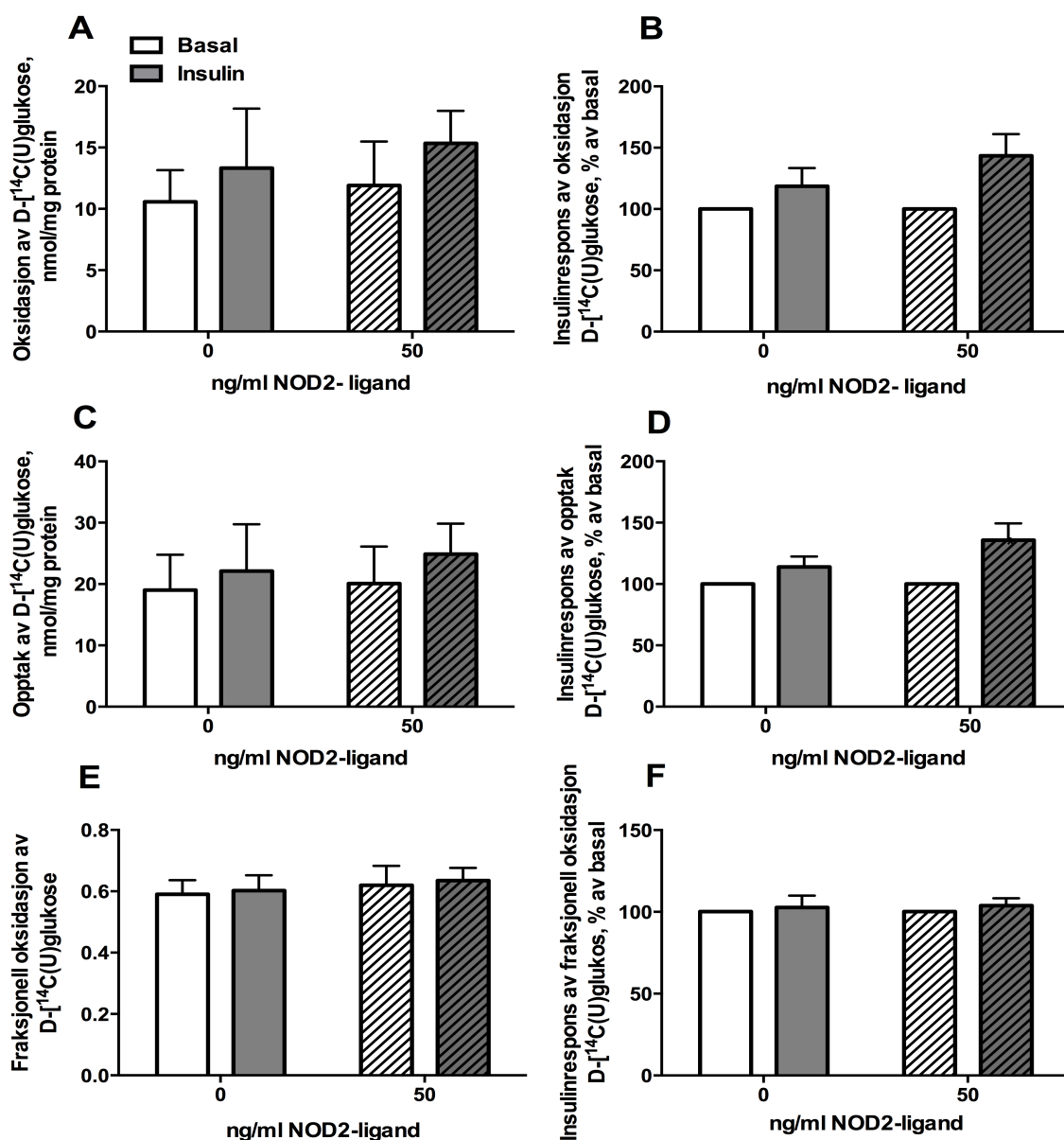
Effekter av NOD2-ligand (50ng/ml) ble videre undersøkt ved en tidsskurve på glukosemetabolisme. I disse forsøkene ble myotubene forbehandlet med NOD2-ligand (50 ng/ml) i 1t, 16t, og 24t før substratoksidasjonsforsøk. Resultatet er vist i figur 3.14 (A-C).



Figur 3.14: Effekter av NOD2-ligand på glukosemetabolisme ved tidsskurve: Myotuber ble forbehandlet med NOD2-ligand (L18-MDP) i 1t, 16t og 24t ved 50ng/ml i inkubator. Etter forbehandling ble NOD2-ligand vasket bort og myotuber ble videre inkubert i fire timer med 200 μ M [¹⁴C]glukose. Glukosemetabolisme ble undersøkt i nærvær av 100 nM insulin. A: Oksidasjon (CO₂) relatert til kontroll. B: Opptak (CO₂ + CA) relatert til kontroll. C: Fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 3 uavhengige forsøk (n=3). * $p \leq 0,05$ vs. kontroll med insulin (paret tosidig t-test).

I tidsskurven var det ingen tydelige effekter av NOD2-stimulering på basal glukosemetabolisme. Men ved 1 times forbehandling med NOD2-ligand var det signifikant reduksjon av både glukoseoksidasjon og glukoseopptak i nærvær av insulin i forhold til kontrollen (Fig.3.14 A,B).

Akutt eksponering med NOD2-ligand (50 ng/ml) på glukosemetabolisme ble i tillegg undersøkt under substratoksidasjonsforsøket. Resultatet er vist i figur 3.15.



Figur 3.15: Effekter av akutt eksponering med NOD2-ligand på glukosemetabolisme: Myotuber ble akutt eksponert for 50ng/ml av NOD2-ligand (L18-MDP) med 200μM [¹⁴C]glukose og CO₂ ble trappet i fire timer. Glukosemetabolisme ble undersøkt i nærvær av 100nM insulin. A,B: Oksidasjon (CO₂). C,D: Opptak (CO₂ +CA). E,F: Fraksjonell oksidasjon. A,C,E: Oksidasjon, opptak, fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. B,D,F: Insulinrespons i % av uten insulin. Dataene er presentert som gjennomsnitt ±SEM fra 4 uavhengige forsøk (n=4).

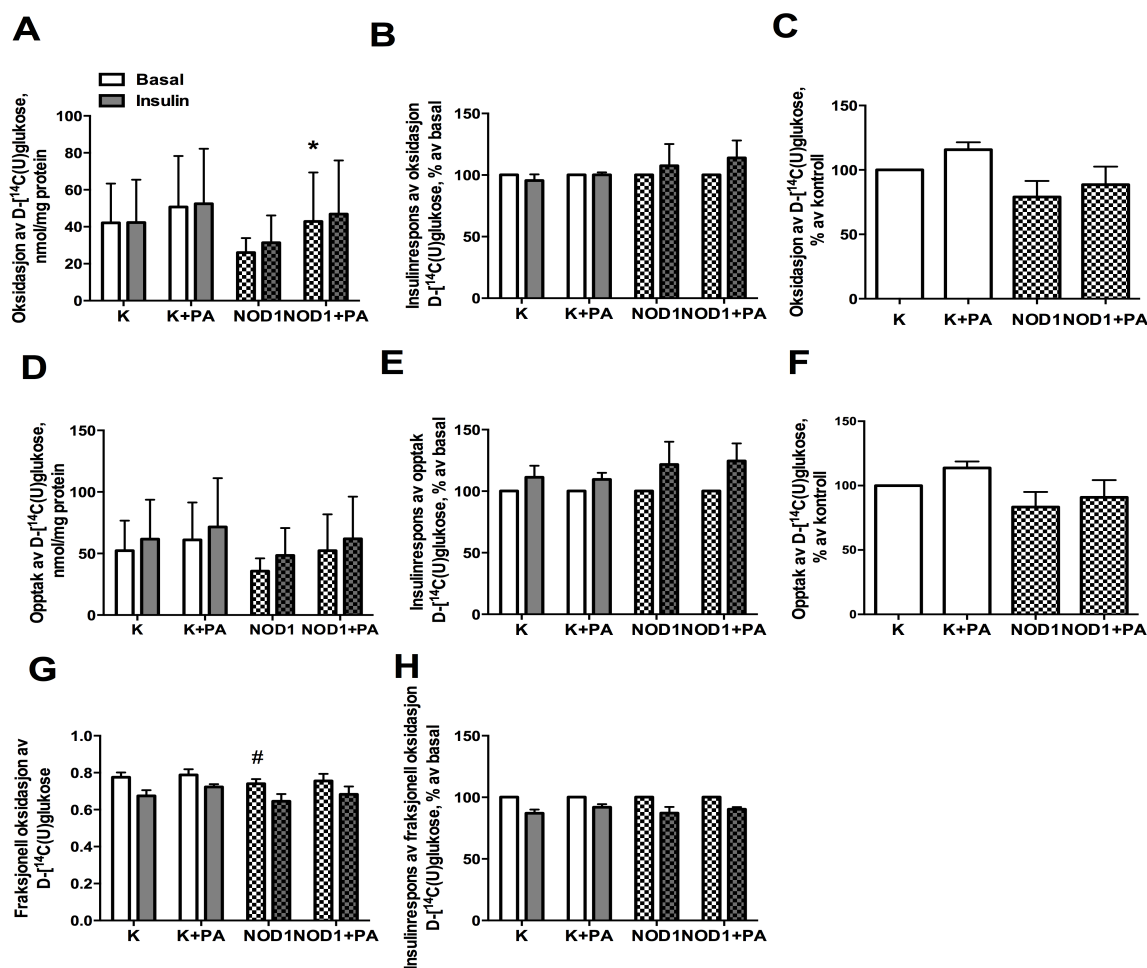
Det var ingen signifikante effekter av NOD2-stimulering på basal glukosemetabolisme og heller ingen signifikant effekt på insulinresponsen (Fig.3.15 A-F).

3.5 Effekt av fettsyrer sammen med spesifikke NOD-ligander på glukosemetabolisme

Mettede langkjedede fettsyrer er vist å aktivere oligomerisering av NOD1- og NOD2-reseptorer [88] og å trigge transkripsjonsaktiviteten til NF- κ B [17]. Palmitinsyre (PA), er en mettet langkjedet fettsyre og er vist i tidligere studier å aktivere TLR2, TLR4 og NLRP3 [39]. PA ble derfor brukt som ko-stimulator for om mulig å potensere effekt av spesifikke NOD1(C12-iE-DAP)- og NOD2(L18-MDP)-ligander på glukosemetabolisme.

3.5.1 Palmitinsyre sammen med NOD1-ligand på glukosemetabolisme

Differensierte myotuber ble forbehandlet med spesifikk NOD1-ligand (50 ng/ml) i blanding med 100 μ M PA i 3 timer før substratoksidasjonsforsøk med glukose som radioaktivt substrat. Glukosemetabolismen ble også undersøkt i nærvær av 100 nM insulin, for å studere effekter av NOD1-ligand med PA på insulinresponsen. Resultatet er vist i figur 3.16.



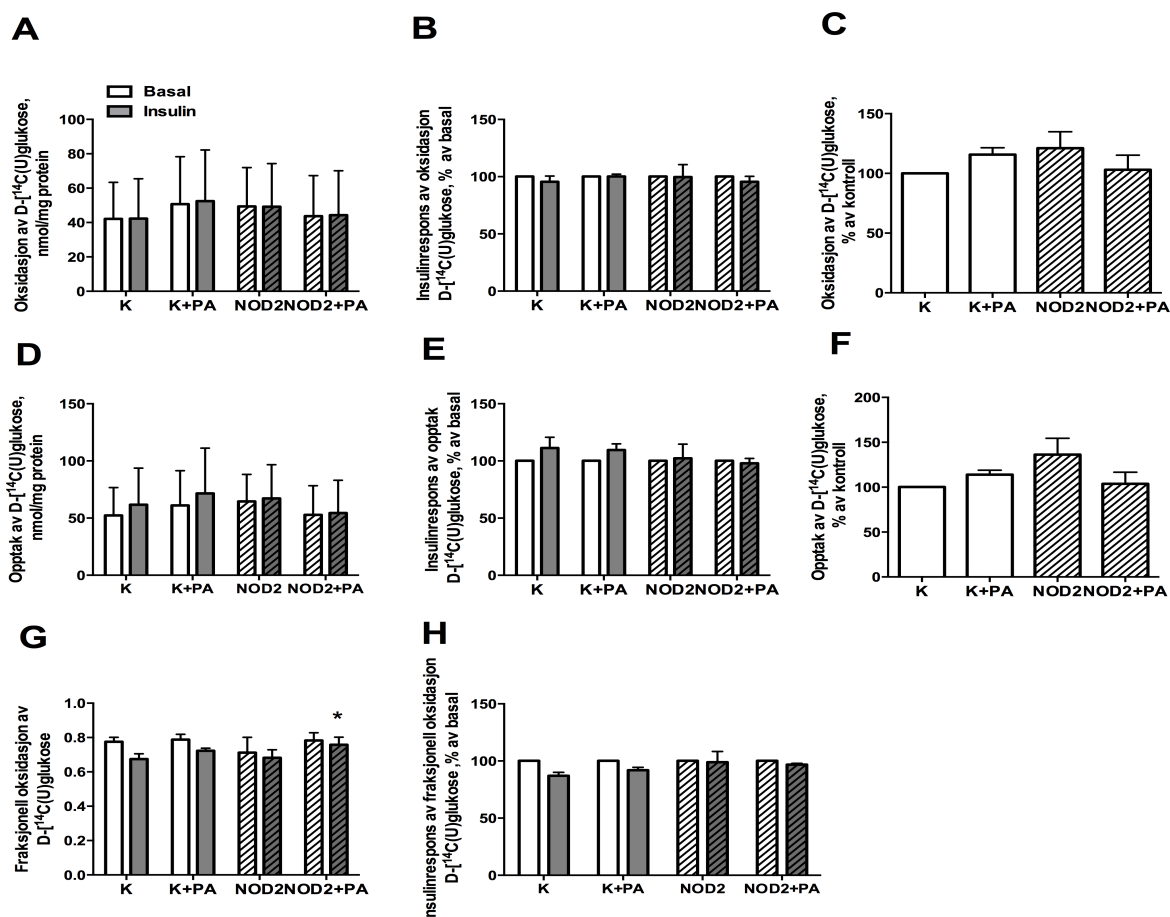
Figur 3.16: Effekter av palmitinsyre (PA) sammen med NOD1-ligand på glukosemetabolisme: Myotuber ble forbehandlet med en blanding av 50ng/ml av NOD1-ligand (C12-iE-DAP) og 100 μ M PA i 3 timer i inkubator. Etter forbehandling ble PA med NOD1-ligand vasket bort og myotuber ble videre inkubert i fire timer med 200 μ M [¹⁴C]glukose. Glukosemetabolisme ble undersøkt i nærvær av 100 nM insulin. A,B,C: Oksidasjon (CO₂). D,E,F: Opptak (CO₂+CA). G,H: Fraksjonell oksidasjon. A,D,G: Oksidasjon, opptak, fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. B,E,H: Insulinrespons i % av uten insulin. C,F: Effekt av PA, NOD1, NOD1+PA i % av kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM fra 4 uavhengige forsøk (n=4). * og # p \leq 0,05 (paret tosidig t-test). * = NOD1+PA vs. K+PA uten insulin, # = NOD1 vs. K uten insulin. K; Kontroll, K+PA; kontroll med palmitinsyre, NOD1; NOD1-ligand, NOD1+PA; NOD1-ligand med palmitinsyre.

PA så ut som hadde effekter på basal glukosemetabolisme, men det var ingen signifikante forskjeller mellom kontroll og kontroll med PA og heller ingen signifikante forskjeller mellom NOD1-ligand og NOD1-ligand med PA. Basal glukoseoksidasjon var signifikant redusert med ca. 40 % ved PA sammen med NOD1-ligand i forhold til kontroll med PA. (Fig.3.16 A,C). Dessuten var det tendens til tilsvarende reduksjon på basalt glukoseopptak ved PA sammen med NOD1-ligand i forhold til kontroll med PA, men dette var imidlertid ikke signifikant (p=0,063) (Fig.3.16 D). Fraksjonell glukoseoksidasjon var redusert med NOD1-ligand i forhold til kontroll (Fig.3.16 G). I disse forsøkene var det ingen tydelig

insulinrespons av PA med NOD1-ligand i forhold til PA med kontroll. PA viste ingen effekt på insulinresponsen (Fig.3.16 A,B,D,E).

3.5.2 Palmitinsyre sammen med NOD2-ligand på glukosemetabolisme

Effekter av 3 timers forbehandling med spesifikk NOD2-ligand (50ng/ml) i blanding med 100µM PA ble også undersøkt på differensierte myotuber før substratoksidasjonsforsøk med glukose som radioaktivt substrat. Glukosemetabolismen ble også undersøkt i nærvær av 100 nM insulin, for å studere effekter av NOD2-ligand sammen med PA på insulinresponsen. Resultatet er vist i figur 3.17.



Figur 3.17: Effekter av palmitinsyre (PA) sammen med NOD2-ligand på glukosemetabolisme: Myotuber ble forbehandlet med en blanding av 50ng/ml av NOD2-ligand (L18-MDP) og 100 µM PA i 3 timer i inkubator. Etter forbehandling ble PA med NOD2-ligand vasket bort og myotuber ble videre inkubert i fire timer med 200µM [¹⁴C]glukose. Glukosemetabolisme ble undersøkt i nærvær av 100 nM insulin.

A,B,C: Oksidasjon (CO₂). D,E,F: Opptak (CO₂+CA). G,H: Fraksjonell oksidasjon. A,D,G: Oksidasjon, opptak, fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. B,E,H: Insulinrespons i % av uten insulin. C,F: Effekt av PA, NOD2, NOD2+PA i % av kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt ±SEM fra 4 uavhengige forsøk (n=4). *p≤0,05 NOD2+PA vs. NOD2 med insulin (paret tosidig t-test). K; Kontroll, K+PA; kontroll med palmitinsyre, NOD2; NOD2-ligand, NOD2+PA; NOD2-ligand med palmitinsyre.

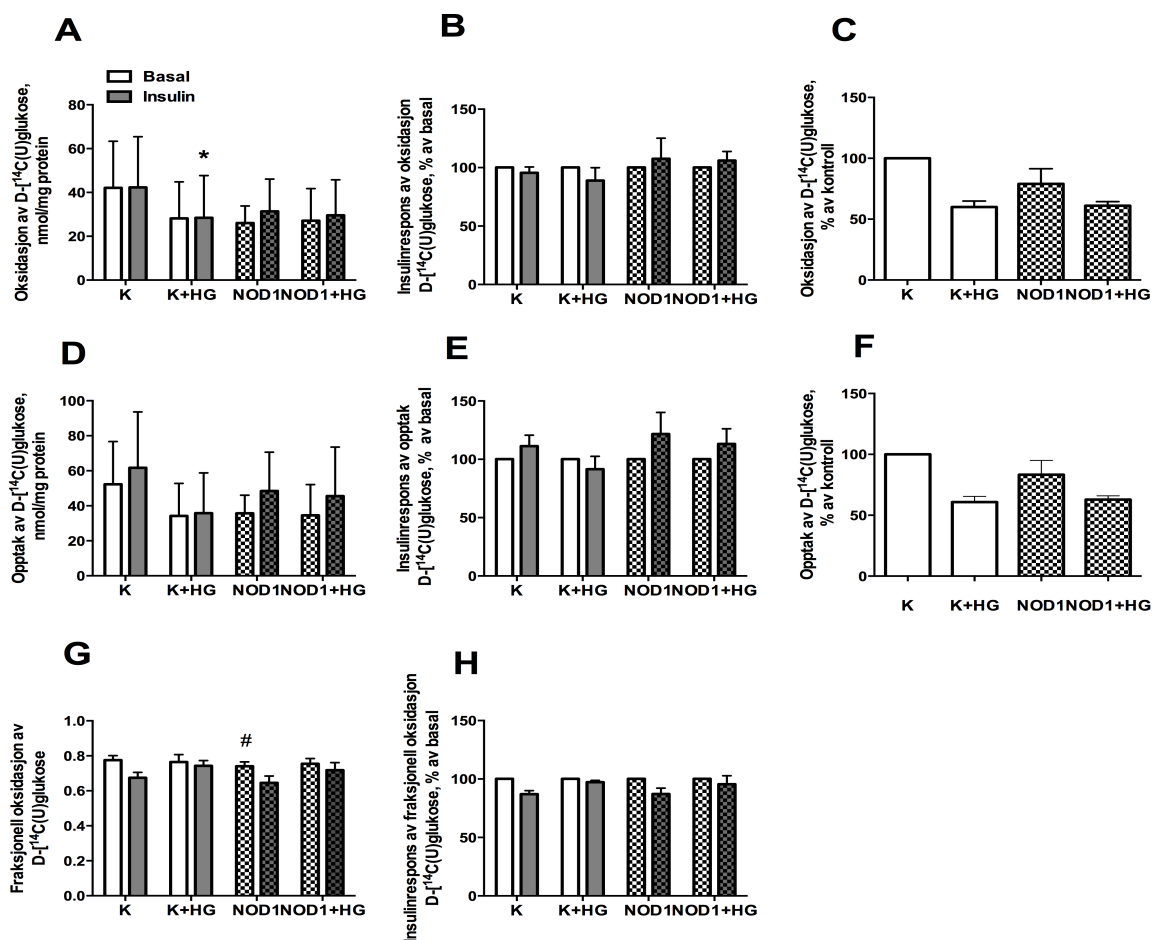
Det var ingen signifikante effekter av PA på NOD2-behandlede celler i forhold til kontroll-celler verken med hensyn på basal eller insulinstimulert glukoseoksidasjon og -opptak (Fig.3.17 A,D). Det var heller ingen signifikante effekter av PA med eller uten NOD2-ligand. Fraksjonell glukoseoksidasjon var økt ved PA med NOD2-ligand i forhold til kun NOD2-ligand i nærvær av insulin (Fig3.17 G). Det var heller ingen forskjell på insulinresponsen med eller uten PA på glukosemetabolisme (Fig3.17 A-H).

3.6 Effekt av hyperglykemi sammen med spesifikke NOD-ligander på glukosemetabolisme

Hyperglykemi (HG) er en vanlig tilstand ved T2D. HG har vist å stimulere mRNA-ekspressjon av NOD1 og NOD2 i monocytter hos normalvektige deltakere [81]. I tillegg kan HG aktivere NLRP3 [39]. Vi ønsket derfor å undersøke om hyperglykemi påvirket effektene av NOD-ligander.

3.6.1 Hyperglykemi sammen med NOD1-ligand på glukosemetabolisme

Differensierte myotuber ble forbehandlet med spesifikk NOD1-ligand (50ng/ml) i blanding med 25mM HG i 3 timer før substratoksidasjonsforsøk med glukose som radioaktivt substrat. Glukosemetabolismen ble også undersøkt i nærvær av 100 nM insulin. Resultatet er vist i figur 3.18 (A-H).



Figur 3.18: Effekter av hyperglykemi (HG) sammen med NOD1-ligand på glukosemetabolisme:

Myotuber ble forbehandlet med en blanding av 50ng/ml av NOD1-ligand (C12-iE-DAP) og 25 mM glukose i 3 timer i inkubator. Etter forbehandling ble HG med NOD1-ligand vasket bort og myotuber ble videre inkubert i fire timer med 200μM [¹⁴C]glukose. Glukosemetabolisme ble undersøkt i nærvær av 100 nM insulin.

A,B,C: Oksidasjon (CO₂). D,E,F: Opptak (CO₂+CA). G,H: Fraksjonell oksidasjon. A,D,G: Oksidasjon, opptak, fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. B,E,H: Insulinrespons i % av uten insulin. C,F: Effekt av HG, NOD1, NOD1+HG i % av kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt ± SEM fra 4 uavhengige forsøk (n=4).

* og # p<0,05 (paret tosidig t-test). *K+HG vs. K med insulin, #NOD1 vs. K uten insulin.

K; Kontroll, K+HG; kontroll med hyperglykemi, NOD1; NOD1-ligand, NOD1+HG; NOD1-ligand med hyperglykemi.

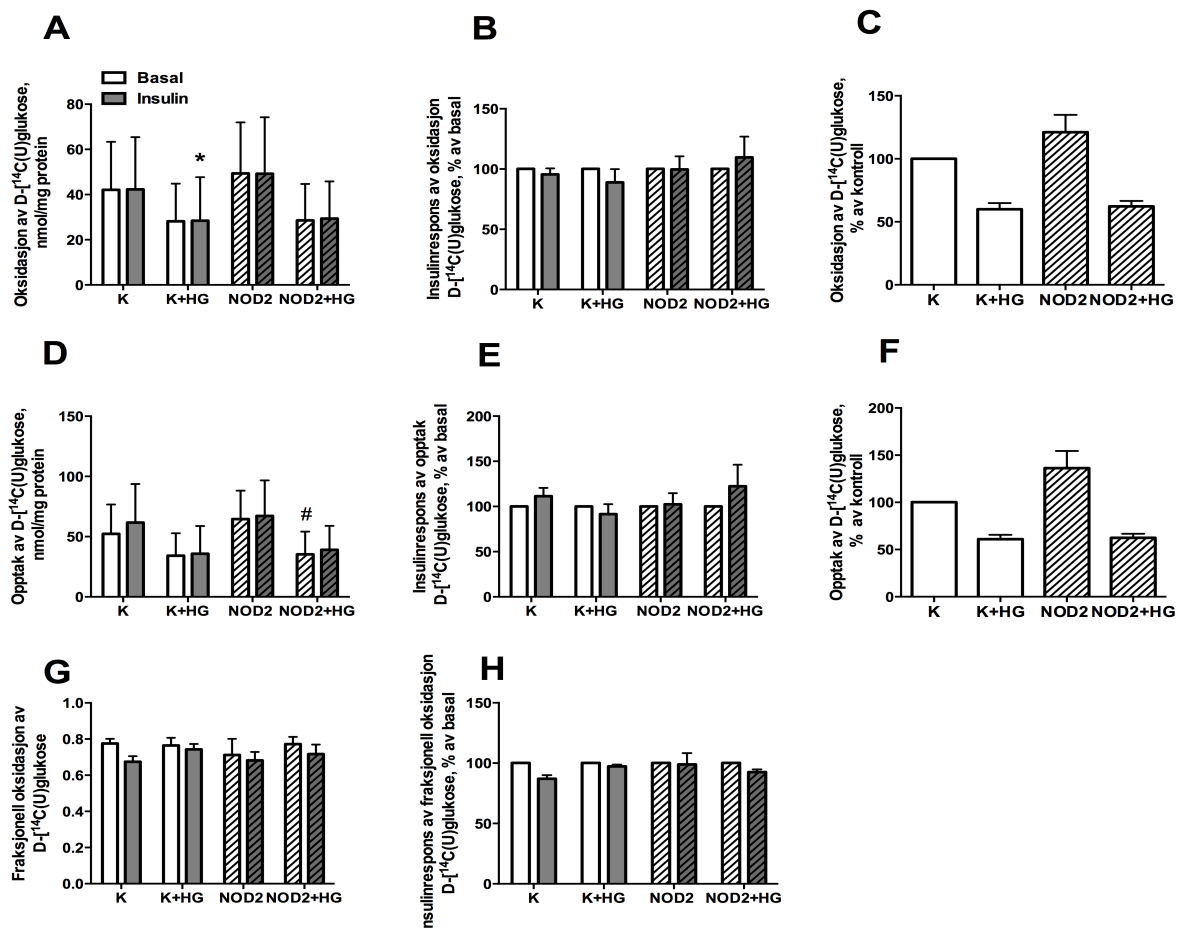
Hyperglykemi alene så ut til å redusere både basalt og insulinstimulert glukoseoksidasjon og -opptak (fig.3.18 A,C,D,F), men imidlertid var det kun signifikant (p= 0,045) reduksjon på ca.40 % av hyperglykemi på glukoseoksidasjon i nærvær av insulin (Fig.3.18 A).

Det var ingen signifikante effekter av hyperglykemi på NOD1-behandlede celler verken på basal eller insulinstimulert glukosemetabolisme (Fig.3.18 A-H). Fraksjonell glukoseoksidasjon var vist redusert ved NOD1-ligand i forhold til kontrollen (Fig.3.18 G).

NOD1-ligand hadde ingen andre signifikante effekter i disse forsøkene og det var heller ingen effekter av insulin (Fig.3.18 A-H).

3.6.2 Hyperglykemi sammen med NOD2-ligand på glukosemetabolisme

Effekter av hyperglykemi sammen med spesifikk NOD2-ligand ble også undersøkt. Differensierte myotuber ble forbehandlet med spesifikk NOD2-ligand (50ng/ml) i blanding med 25mM HG i 3 timer før substratoksidasjonsforsøk med glukose som radioaktivt substrat. Glukosemetabolismen ble også undersøkt i nærvær av 100 nM insulin. Resultatet er vist i figur 3.19.



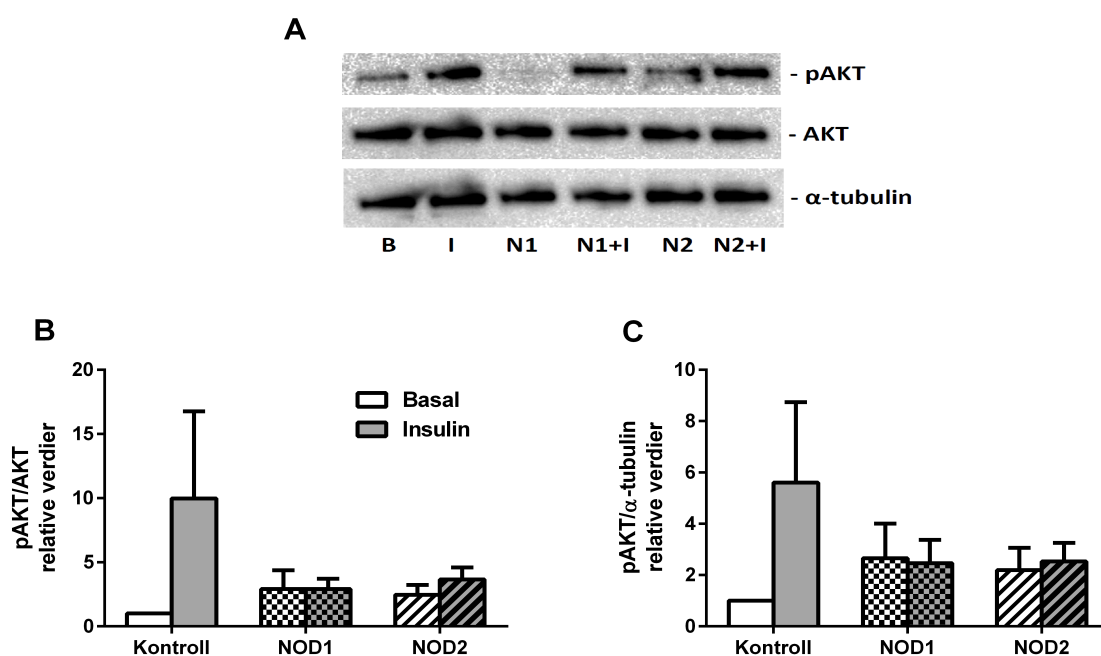
Figur 3.19: Effekter av hyperglykemi (HG) sammen med NOD2-ligand på glukosemetabolisme: Myotuber ble forbehandlet med en blanding av 50ng/ml av NOD2-ligand (L18-MDP) og 25 mM glukose i 3 timer i inkubator. Etter forbehandling ble HG med NOD2-ligand vasket bort og myotuber ble videre inkubert i fire timer med 200μM [¹⁴C]glukose. Glukosemetabolisme ble undersøkt i nærvær av 100 nM insulin. A,B,C: Oksidasjon (CO₂). D,E,F: Opptak (CO₂+CA). G,H: Fraksjonell oksidasjon. A,D,G: Oksidasjon, opptak, fraksjonell oksidasjon relatert til kontroll. B,E,H: Insulinrespons i % av uten insulin. C,F: Effekt av HG, NOD2, NOD2+HG i % av kontroll. Dataene er presentert som gjennomsnitt ±SEM fra 4 uavhengige forsøk(n=4). *og # p≤0,05 (paret tosidig t-test). *= K+HG vs. K med insulin, # = NOD2+HG vs. NOD2 uten insulin. K; Kontroll, K+HG; kontroll med hyperglykemi, NOD2; NOD2-ligand, NOD2+HG; NOD2-ligand med hyperglykemi.

Hyperglykemi alene tenderte til å redusere både basal og insulinstimulert glukoseoksidasjon og -opptak (Fig.3.19 A,D), men det var signifikant reduksjon ($p=0,045$) av hyperglykemi på glukoseoksidasjon bare i nærvær av insulin (Fig.3.19 A). HG reduserte i tillegg basalt glukoseopptak i NOD2-behandlede celler (Fig.3.19 D).

Det var ingen signifikante effekter av NOD2-ligand i disse forsøkene og heller ingen effekter av insulin fig.3.19 (A-H).

3.7 Effekter av NOD-ligander på insulinsignalerings

I alle glukosemetabolismeforsøkene er det vist liten effekt av insulin. Dette stemmer overens med at muskelceller i kultur inneholder lite GLUT4 [89]. Det har derfor vært vanskelig å fange opp effekt av NOD-ligander på insulinresponsen under substratoksidasjonsmetoden. Western blotting ble benyttet for å undersøke effekt av NOD1- og NOD2-ligander på insulinsignalerings. Akt er et sentralt protein i insulinsignalveien. Dessuten er det vist redusert Akt fosforylering i insulinsignalerings på NOD2 behandlede L6-muskelceller [27]. Akt ble derfor studert. Cellene ble stimulert med 100nM insulin i 15 minutter før høsting. Resultatet er vist i figur 3.20.



Figur 3.20: Effekter av NOD-ligander på insulinsignalerings: Etter 4-7 dager i differensieringsmedium ble myotuber først forbehandlet med NOD1-ligand(50ng/ml) og NOD2-ligand(50ng/ml) i 3 timer i inkubator. Etter forbehandling med NOD-ligander ble myotuber videre enten forbehandlet med 100nM insulin i 15 minutter eller kun DPBS m/hepes. Etter forbehandlingen ble muskelceller høstet og prøvene ble kjørt på gelelektroforese og blottet over til membranen. Etter blokkering og vasking ble membranen tilsatt antistoffer mot fosforylert AKT (Ser⁴⁷³), total AKT og α-tubulin og ble deretter kvantifisert ved detektering av kjemiluminescens. **A:** Westernblott fra en donor. B; kontroll uten insulin, I; Kontroll med insulin, N1; NOD1-ligand 50ng/ml uten insulin, N1+I; NOD1-ligand 50ng/ml med insulin, N2; NOD2-ligand 50ng/ml uten insulin, N2+I; NOD2-ligand 50ng/ml med insulin. **B:** Kvantifisert Western blott fra 4 uavhengige forsøk (n=4). Verdiene er relatert til kontroll uten insulin (satt til 1) og presentert som fosforylert AKT relatert til total AKT. **C:** Kvantifisert Western blott fra 4 uavhengige forsøk (n=4).Verdiene er relatert til kontroll uten insulin (satt til 1) og presentert som fosforylert AKT relatert til α-tubulin. Dataene er presentert som gjennomsnitt ±SEM fra 4 uavhengige forsøk (n=4).

Figur 3.20 (B-C) viser at insulin ser ut til å gi økt Akt-fosforylering i kontrollcellene, men denne effekten er borte i NOD-behandlede celler. Dette kan tyde på at NOD-ligandene motvirker effekten av insulin. Effektene er imidlertid ikke signifikante. Akt-fosforylering ble undersøkt både i forhold til Akt og α -tubulin som er konstitutive, altså house-keeping proteiner. NOD-ligand-respons var forholdsvis lik i begge, noe som tydet på at Akt i seg selv ble ikke påvirket av NOD-ligander (Fig.3.20 A-C).

4.Diskusjon

4.1 Satellittceller til human myotuber *in vitro*, modell for human skjelettmuskel *in vivo*

Som beskrevet tidligere i denne oppgaven ble isolerte satellittceller fra skjelettmuskelbiopsier aktivert til myoblaster via proliferasjon og differensiert til flerkjernede myotuber. Denne modellen ble brukt videre til å studere både glukose- og fettsyremetabolisme. Bakgrunnen bak valg av modellen er først og fremst at gruppen har lang erfaring med myotuber for å studere glukose- og fettsyremetabolisme *in vitro*. Uttrykket av proteiner som er viktig i glukose- og fettsyremetabolisme økes under differensiering av myoblaster til myotuber og ligner på human skjelettmuskel *in vivo*. Denne modellen gir oss et reelt bilde av morfologi, metabolske og biokjemiske egenskaper til en moden human skjelettmuskel [89]. Ulempen med cellemodellen er at det er lavere insulinstimulert glukoseopptak i myotuber *in vitro* sammenlignet med muskelfibre *in vivo*. Al-Khalili et al. viste at dette kan skyldes at insulinstimulert glukosetransportør GLUT4 er lavere uttrykt i myotuber *in vitro* enn i skjelettmuskel *in vivo* [90]. Videre er forholdet GLUT1:GLUT4 høyere i myotuber *in vitro* enn voksen skjelettmuskel *in vivo* [91].

Resultatene våre var i samsvar med dette. Det var vanskelig å fange opp insulinresponser både på glukoseoksidasjon og glukoseopptak i myotuber i de fleste forsøkene under substratoksidasjonsforsøk. Det ble dessuten brukt en høyere konsentrasjon av insulin på 100nM enn fysiologiske konsentrasjon, som ligger i pikogram-området [89], for å øke translokasjon av GLUT4 til plasmamembranen.

En annen begrensede faktor er antall passasjer satellittceller er dyrket opp til myoblaster før de lagres i nitrogentanken til videre oppdyrking. Med økende passasjenummer reduseres både prolifereringspotensialet og differensieringskapasiteten til myotubene. Flere metabolske prosesser som glukoseopptak, glukoseoksidasjon og fettsyre- β -oksidasjon blir gradvis redusert som følge av økende passasjenummer [92]. En fordel ved cellemodellen er at man kan kontrollere ekstracellulært miljø og tilpasse differensieringsgrad av myotuber, og cellene er ikke immortaliserte [89].

I denne oppgaven er det brukt samme celledyrkingsprosedyre for alle cellene, og det er benyttet donorer fra friske deltakere fra passasje 3 og 4. Dette gir ikke grunnlag til å forvente forskjellige responser basert på passasjenummer. Det har vært utfordringer under celledyrking, blant annet få celler med lave proteinverdier, at celler løsnet fra celleplaten etter differensiering, noe som er blant grunnene til at jeg ikke fikk gjort alle de forsøkene jeg hadde ønsket meg.

4.2 mRNA-ekspresjon av NOD1 og NOD2 i humane myotuber

Et Northern-blot i en tidlig studie viste at NOD1 er uttrykt i human hjerte- og skjelettmuskel blant andre humane vev [73]. I en annen studie demonstrerte Tamrakar et al. mRNA-uttrykk av NOD1- og NOD2-reseptorer i L6-myotuber, hvor NOD1 var mer uttrykt enn NOD2 [27]. Dette er i samsvar med mRNA-ekspresjon demonstrert av vår forskningsgruppe hvor både NOD1 og NOD2 er uttrykt i humane myotuber, men NOD1 er mer uttrykt i forhold til NOD2. Til sammenligning er NOD1 og NOD2 mye lavere uttrykt enn TLR4 i humane myotuber. Det lave uttrykket forteller oss at den forventede effekten av NOD-ligander ikke blir så stor, noe som stemte overens med at vi fant små effekter på energimetabolismen.

NOD-ligander og HG har vist å kunne oppregulere NOD1- og NOD2-reseptorer i humane monocytter [81]. Tilsvarende økte MDP i L6-myotuber mRNA-ekspresjon av NOD2 med økende tid [29]. Det var ingen metabolske effekter av NOD-ligander ved økende tid i denne studien, noe som kan tyde på NOD-ligander alene ikke var nok til å øke ekspresjon av NOD-reseptorer. Videre viste HG (25mM) selv har effekter på glukosemetabolisme, men ikke sammen med NOD-ligander i denne studien, noe som antagelig skyldes kort inkuberingstid av NOD-ligander med HG. PA ble forsøkt for å øke oligomeriseringsaktiviteten til NOD1 og NOD2 [88]. Det var heller ikke tydeligere effekter av NOD1- og NOD2-ligander sammen med PA, noe som antagelig også skyldes kort inkuberingstid med PA. Videre er det rapportert i en studie at PA eller HG alene ikke var nok til å øke ekspresjon av NOD1-reseptorer i HL-1 hjertemuskelceller, men kombinasjon av PA og HG i økende konsentrasjoner etter 48 timers inkubering ga økt ekspresjon av NOD1-reseptorer [78]. Det var videre først ønskelig å oppregulere NOD-reseptorer i humane myotuber ved å forbehandle humane muskelceller med kombinasjon av PA og HG før videre behandling med

NOD-ligander. TLR4 i myotuber kan også aktiveres av mettede langkjedede fettsyrer som PA [39] og kan øke sin følsomhet og ekspresjon i nærvær av PA. Denne modellen var tenkt videre brukt til å studere både proteinnivå og mRNA-ekspresjon av NOD-reseptorer og videre til å studere direkte effekter av NOD-ligander på energimetabolisme relatert til kontroll forbehandlet med PA og HG. Dette ble ikke undersøkt grunnet tidsbegrensning.

4.3 Effekter av NOD-ligander på glukose- og oljesyremetabolisme i humane myotuber

Et hovedfunn i denne studien var at både uspesifikk NOD1/2-ligand og spesifikk NOD1-ligand reduserte oljesyremetabolismen i myotuber ved korttidsbehandling. Ved 3 timers forbehandling reduserte uspesifikk NOD1/2-ligand både oljesyreoksidasjon og oljesyreopptak. NOD1-ligand ga tilsvarende en signifikant reduksjon av oljesyremetabolisme ved akutt eksponering, men imidlertid kun redusert oljesyreoksidasjon etter 3 timers forbehandling. Dette viser at NOD1-ligand har evne til å redusere oljesyremetabolismen. NOD2-ligand hadde ikke effekt på oljesyremetabolisme i denne studien. Dette er i samsvar med mRNA-ekspresjonen, hvor NOD1-reseptorer er dobbelt så mye uttrykt i forhold til NOD2-reseptorer i humane skjelettmuskelceller.

Det er vist at NOD1/2-knockout mus var beskyttet mot inflammasjon og lipidakkumulering ved høyfettdiett i 16 uker [28]. I tidligere studier er det vist økt uttrykt av NOD1 i hjertemuskel hos T2D [78] og i subkutan fettvev og fettceller hos pasienter med metabolsk syndrom [80]. I en annen studie er det vist redusert fettmasse, vektøkning og glukoseintoleranse ved høyfettdiett i NOD1-knockout mus og ikke i NOD2-knockout mus [49]. Dette kan tyde på at NOD1 kan kanskje spille en rolle i regulering av fettsyremetabolisme og videre i inflammasjon induisert av fettrik diett.

Hittil er det, så vidt vi vet, ikke gjort noen studier på betydningen av NOD1 og NOD2 på regulering av fettsyremetabolisme i skjelettmuskelceller. I en nylig publisert studie ble det imidlertid vist økt ROS-produksjon og redusert mitokondriefunksjon i L6-myotuber etter NOD2-aktivering. Dette ble målt som redusert citrat syntase-aktivitet, redusert ATP-nivå, endret ekspresjon av flere gener involvert i mitokondriefunksjon og redusert maksimal

respiratorisk aktivitet [29]. Det er ikke gjort noen tilsvarende studie av NOD1 på L6-myotuber knyttet til mitokondriefunksjon.

Til sammenligning er det publisert studier av andre bakterieprodukter som LPS, ligand til TLR4. LPS er, i likhet med NOD-ligander, PAMP og aktiverer det medfødte immunsystemet, NF- κ B og MAPK etter TLR4-aktivering. NOD1 og TLR4 er begge PRR til to ulike deler av en og samme bakterie, henholdsvis peptidoglykan og LPS [39, 42, 71]. Frisard et al. demonstrerte i sin studie hvor TLR4-aktivering med LPS reduserte fettsyreoksidasjon både i C2C12 gnagere- og humane myotuber [93]. Videre viste samme forfatteren i sin annen studie redusert mitokondriefunksjon som årsak bak redusert fettsyreoksidasjon både i C2C12 gnagere- og humane myotuber etter TLR4-aktivering ved LPS [94]. Redusert oljesyreoksidasjon av NOD1-ligand er i samsvar med resultatet fra LPS. Dette tyder på at mitokondriefunksjon kan endres ved aktivering av PRR, TLR4- og NOD-reseptorer i humane skjelettmuskelceller med redusert fettsyremetabolisme som resultat.

Dysregulering eller forstyrrelse i fettsyremetabolisme i skjelettmuskler er antatt å være årsak til akkumulering av IMTG, som DAG og ceramider, og videre til IR utvikling [3]. Ved T2D har man trolig en forstyrret fettsyremetabolisme [3, 11]. Oksidasjon av lipider i muskelfibre er redusert hos overvektige og personer med T2D [95, 96]. Vi har funnet redusert oljesyremetabolisme i denne studien, et tegn på at NOD1- og NOD1/2-ligander kan føre til akkumulering av intramyocellulært fett og lipider i form av IMTG. Men i og med at NOD1 er så lite uttrykt i skjelettmuskelceller, antas dannelsen av IMTG å komme først tilsyne ved oppregulering av NOD-reseptorer eller i samarbeid med andre PRR i skjelettmuskelceller som i tilstrekkelig grad er uttrykt og reduserer fettsyreoksidasjonen. TLR4-aktivering kan redusere fettsyreoksidasjon i humane skjelettmuskelceller [93] og er, på mRNA-nivå, 7 ganger mer uttrykt i forhold til NOD1 i skjelettmuskelceller. TLR4-aktivering ved endogene molekyler som mettede fettsyrer (PA) og LPS kan trolig sammen med NOD1-aktivering ytterligere redusere fettsyreoksidasjon og øke utskillelsen av pro-inflammatoriske cytokiner og kjemokiner i skjelettmuskelceller via aktivering av NF- κ B og JNK, noe som kan bidra videre til utvikling av IR [34, 97]. Det ble ikke sjekket eventuell synergisk effekt av TLR4-aktivering via PA sammen med NOD1 på oljesyremetabolisme og insulinsignalerings i dyrkede humane myotuber i denne studien grunnet tidsbegrensning.

Et annet viktig funn i denne studien er at NOD2-ligand viste små korttidseffekter på basal glukosemetabolisme. Både basal glukoseoksidasjon og -opptak ble redusert ved 3 timers forbehandling med NOD2-ligand. NOD1-ligand hadde imidlertid ikke signifikante effekter på basal glukosemetabolisme ved 1ng/ml og 50ng/ml ved 3 timers forbehandling. Resultatet er ikke i samsvar med mRNA-ekspresjonen av NOD-reseptorer i humane myotuber. Dette forteller at mRNA-ekspresjon ofte ikke korrelerer med proteinuttrykk. Det kan tyde på posttranskripsjonelle kontrollpunkter for NOD2-proteininnholdet i muskel. På L6-myotuber er det også vist effekter av NOD2-reseptorer som er mindre uttrykt i forhold til NOD1-reseptorer [27]. Det er vist tidligere at proteinuttrykk av andre proteiner ikke alltid korrelerer med mRNA-ekspresjon [9].

Det er usikkerhet i resultatene på grunn av få forsøk, ulike donorer benyttet i hvert forsøk og stor spredning. Effekter av forbehandling med NOD1- og NOD2-ligander i 3 timer på basal glukosemetabolisme var ikke i samsvar med resultatet under forsøkene i kombinasjon med PA og HG. Det er nødvendig med flere forsøk for å avklare effektene av NOD1- og NOD2-ligander på basal glukosemetabolisme.

På muskel er det hittil, så vidt vi vet, kun en studie på L6- rottemyotuber på regulering av glukosemetabolisme [27]. I denne studien ble det ikke funnet noen effekt på basalt glukoseopptak, men redusert insulinstimulert glukoseopptak etter 3 timer NOD2-stimulering. NOD1-ligand hadde ingen effekter verken på basalt eller insulinstimulert glukosemetabolisme i L6-muskelceller.

PA ble brukt for å øke oligomerisering og potensering av effekten til NOD-ligander [88] og HG for å øke ekspresjon av NOD-reseptorer [81]. Forbehandling med 50ng/ml av NOD1- og NOD2-ligander sammen med enten palmitinsyre (100μM) eller glukose (25mM) forsterket ikke effektene av NOD-ligander. PA med NOD1-ligand reduserte signifikant glukoseoksidasjon i forhold til kontroll med PA, noe som muligens skyldes NOD1-ligand og ikke PA (Fig 3.16A). Årsaken kan være at PA alene i korttidsinkubering med NOD-ligander ikke var tilstrekkelig til å øke oligomerisering av NOD-ligander og utøve effekt på glukosemetabolismen. HG alene viste effekter på glukosemetabolismen. HG reduserte insulinstimulert glukoseoksidasjon i forhold til kontrollen samt basal glukoseopptak sammen med NOD2-ligand i forhold til NOD2-liganden. Dette er i samsvar med i tidligere studier

hvor HG reduserer både glukoseoksidasjon og glukoseopptak i humane skjelettmuskelceller [98, 99].

Hemmende effekter av NOD2-aktivering på basal glukosemetabolisme kan resultere i hyperglykemi som ytterligere vil kunne redusere glukoseopptak, glukoseoksidasjon i humane myotuber [98, 99]. Det er vist hyperglykemi promoterer lipogenese og øker akkumulering av TAG i humane myotuber [99]. I skjelettmuskel vil en slik akkumulering av IMTG kunne føre til lipotoksisitet ved at lipidderivater innvirker negativt på insulinsignalerings [33]. Siden det er vist små effekter på glukosemetabolisme etter NOD2-aktivering, er det mulig at effekten først kommer til tilsyne i den periferte skjelettmuskulaturen *in vivo* når NOD-reseptorene er tilstrekkelig oppregulert.

Glukose- og fettsyremetabolisme er avhengig av mitokondrier til å generere energi i cellene. Det er tidligere vist at NOD2-aktivering i L6-myotuber induerte økt ROS-produksjon assosiert med redusert ATP-produksjon, endret ekspresjon av gener knyttet til mitokondriefunksjon og førte til mitokondriedysfunksjon [29]. I denne studien er det ikke målt ROS-produksjon i NOD-behandlede myotuber, men det kan tenkes at redusert glukose- og fettsyremetabolisme i humane skjelettmuskelceller kan skyldes mitokondriedysfunksjon eller er en følge av redusert AMPK-aktivitet i skjelettmuskelceller. AMPK-aktivitet er imidlertid heller ikke målt i denne studien.

Det kan være at NOD1- og NOD2-ligander undertrykker AMPK-aktivitet, det er en hypotese at tarmmikrobiota reduserer AMPK-avhengig fettsyreoksidasjon i skjelettmuskelceller og kan bidra til utvikling av fedme [51, 63]. Redusert AMPK-aktivitet kan føre til redusert translokasjon av glukosetransportør GLUT4 og fettsyretransportør CD36 til plasmamembranen for glukose- og fettsyreopptak i skjelettmuskelceller [18, 19]. Aktivert AMPK medierer fosforylering av flere transkripsjonsfaktorer som er sentrale i regulering av gener involvert i mitokondrie-biogenese og i beskyttelse mot oksidativt stress i mitokondrier [16]. I tidligere studier er redusert fettsyreoksidasjon i skjelettmuskelceller hos overvektige personer vist forårsaket av redusert mitokondrieinnhold i skjelettmuskelceller som følge av redusert mitokondriebiogenese og mitokondriedysfunksjon [100].

4.4 Effekter av NOD-ligander på insulinstimulert glukosemetabolisme og Akt-fosforylering

På grunn av dårlig insulinrespons i humane myotuber brukes insulin i konsentrasjonsområde 0,1-1 μ M for å studere glukose- og fettsyremetabolisme i humane myotuber [90, 99, 101]. Dette er høyere insulinkonsentrasjon enn den fysiologiske som ligger i pikogram-området [89]. I denne studien er det brukt 100nM insulin for å studere glukosemetabolisme som typisk vil gi 40-50% økning av glukoseopptak i humane myotuber [90, 102]. I L6-muskelceller ga 100nM insulin 2,5x økning av glukoseopptaket [27]. Til tross for høyere insulin-konsentrasjon enn den fysiologiske var det fortsatt vanskelig å fange opp insulinresponser både på glukoseopptak og glukoseoksidasjon i kontrollceller i de aller fleste forsøkene under substratoksidasjonsforsøk. Dette gjorde det vanskelig å studere effekter av NOD-ligander på insulinrespons på glukosemetabolisme.

Insulinstimulert glukoseopptak var derfor ingen god metode for å detektere eventuelle effekter på insulinresponser i humane myotuber. Western immunblotting ble derfor benyttet for å studere insulinstimulert fosforylering av Akt. Akt ble valgt fordi Akt er et sentralt protein i insulinsignalveien. I tillegg er det vist moderat redusert Akt-fosforylering i insulinsignalerende *in vitro* i myotuber fra T2D-personer [103, 104].

I både NOD1- og NOD2-behandlede myotuber (3 timer med 50 ng/ml av hver ligand) var insulinstimulert Akt(Ser473)fosforylering ikke observerbar med Western blotting. Insulin stimulerte tilsynelatende fosforylering av Akt(Ser473) i kontrollcellene, men på grunn av stor variasjon og få forsøk var ikke effekten statistisk signifikant. Akutt eksponering med 50ng/ml NOD1-ligand reduserte både insulinstimulert glukoseoksidasjon og -opptak. Tilsvarende reduserte 1 times forbehandling med 50ng/ml NOD2-ligand insulinstimulert glukoseoksidasjon og -opptak.

Til sammenligning var resultatene i denne studien i samsvar med tidligere utført studie på L6-rottemyotuber hvor NOD2-aktivering svekket insulinsignalerende og reduserte IRS-1-tyrosinfosforylering og Akt(Ser473)fosforylering etter 3 timers forbehandling [27]. Til forskjell fra dosen på 10 μ g/ml av NOD2-ligand brukt på L6-rottemyotuber [27], fikk vi effekt i denne studien ved 50ng/ml av både NOD1- og NOD2-ligander. Dette kan

sannsynligvis skyldes en forskjell i respons i muskel fra dyr og menneske. I humane fettceller var det tilsvarende resultat funnet av NOD1-ligand som svekket insulinsignalering og reduserte insulinstimulert glukoseopptak [82, 83]. NOD1-aktivering ga også IR i 3T3-L1-fettceller og leverceller fra mus [28, 79].

Til tross for lite uttrykk av NOD-reseptorer i humane myotuber *in vitro* tyder denne studien på at NOD-ligander kan påvirke skjelettmuskulatur direkte, uten tilstedeværelse av andre celletyper og PRR-ligander, og kan bidra til IR i myotuber. *In vivo* vil det alltid være flere celletyper som immunceller (makrofager) og andre PRR-ligander (PA, LPS) involvert, noe som eventuelt kan forsterke responsen i skjelettmuskelceller. Vi hadde forventet å få et større utslag på insulinresponsen med PA tilstede sammen med NOD1- og NOD2-ligander i og med at PA er en PKC-modulator og aktiverer NF- κ B via TLR4-reseptorer [17, 39, 105]. Men resultatet kom ikke tydelig frem på insulinstimulert glukoseopptak under substratoksidasjonsforsøket på grunn av dårlig insulinrespons i kontrollprøvene. Det kunne derfor vært interessant å studere PA sammen med NOD-ligander på insulinstimulert Akt-fosforylering.

IR i skjelettmuskelceller er også assosiert med mitokondriedysfunksjon, og en økning i oksidativ stress som følge av NOD-ligander kan tenkes være en underliggende mekanisme for å potensere mitokondriedysfunksjon og IR i skjelettmuskelceller [29, 106]. Redusert glukose- og oljesyremetabolisme i myotuber med NOD-ligander resulterer i akkumulering av fettsyrer og hyperglykemi i blodet. Fettsyrer, hyperglykemi og bakterieprodukter (LPS, MDP) er modulatorer for ROS-produksjon. ROS er aktivator for serin-kinasene som JNK som serin-fosforylerer IRS-1 og hemmer videre insulinsignalering og reduserer insulinrespons [34, 106, 107](Fig.1.3).

Det er brukt ulike donorer under Western blotting og substratoksidasjonsforsøkene. Dette gav oss et innblikk i individuelle variasjoner, og det er positivt at resultatene pekte i samme retning med ulike donorer. Imidlertid er verdiene ikke signifikante på Western blotting og er kun basert på 4 uavhengige forsøk for hver NOD-ligand. Det er nødvendig å gjøre flere forsøk for å avklare effekten av NOD-ligandene på insulinrespons ved hjelp av Western blotting som er en mer effektiv metode enn substratoksidasjonsmetoden for å fange opp insulineffekter.

4.5 Mulige mekanismer bak effekter av NOD-ligander

I denne oppgaven er det verken målt cytokiner eller serin-kinase-aktivitet i myotuber forbehandlet med NOD1-/NOD2-ligander grunnet tidsbegrensning, noe ville kunne fortelle oss om effektene av NOD-ligander på humane myotuber forårsakes av stimulering av NOD-reseptorer eller av inflammasjonsmediatorer (protein kinaser, cytokiner). Siden vi fikk effekt både på oljesyremetabolisme og glukosemetabolisme innen 3-4 timer, tyder det på at det er en direkte stimulering av NOD1- og NOD2-reseptorer og at nedstrøms kinaser kan være involvert i effektene vi ser.

Som nevnt ovenfor er det rapportert at NOD2-ligand induserer ROS-produksjon og mitokondriedysfunksjon i L6-myotuber [29]. Dette kan være en medvirkende årsak til redusert glukose- og oljesyremetabolisme samt IR-utvikling. ROS-produksjon og kinaser som RIP2, JNK, ERK og p38MAPK var økt etter 3 timers forbehandling med NOD2-ligand (MDP) i L6-myotuber [29]. Aktivisering av serin-kinaser kan serinfosforylere IRS-1 og hemme insulinsignaler og bidra videre til redusert insulinrespons. Videre ble L6-myotuber forbehandlet med MDP i 6-24 timer i en tidsskurve før mRNA-transkripsjon av pro-inflammatoriske cytokiner (TNF- α , IL-6) ble målt statistisk signifikant i studie demonstrert av Maurya et al. [29]. Dette kan tyde på at det tar tid til mRNA-transkripsjon av inflammatoriske cytokiner før deres effekt fører videre til insulinhemming.

Det er korttidseffekter av NOD-ligander på insulin i denne studien og kan skyldes aktivisering av nedstrøms serin-kinaser. Men dette er kun spekulasjoner, og trengs å gjøre det i praksis på grunn av ulike doser av NOD-ligander og en forskjell i respons i muskel fra dyr og menneske.

4.6 Veien videre

I denne masteroppgaven er det forsøkt å undersøke effekter av syntetiske bakterieprodukter (NOD-ligander) i humane myotuber *in vitro*. Det er gjennomført flere forsøk med et ulikt antall donorer. Lavt uttrykt av NOD-reseptorer i humane skjelettmuskelceller kan forklare små effekter på energimetabolisme. I senere studier vil det være aktuelt å øke uttrykket av reseptorene i humane skjelettmuskelceller. NOD-ligander, hyperglykemi og palmitinsyre er vist å øke ekspresjon av NOD-reseptorer i humane monocytter og HL-1 hjertemuskelceller [78, 81]. Derfor kunne det vært ønskelig å forbehandle humane skjelettmuskelceller først i kombinasjon av HG og PA under differensiering av myotuber i litt lengre tid inntil 48 timer [78] for om mulig å øke proteinuttrykk og behandle etter med NOD-ligander i 3 timer. Før videre utførelse av forsøk er det nyttig å måle oppregulering av proteinekspresjon av NOD-reseptorer ved hjelp av immunofluorescence samt mRNA ekspresjon ved hjelp av real-time PCR. Palmitinsyre vil i tillegg øke aktivering av TLR4 samt oligomeriseringsaktiviteten til NOD1- og NOD2-reseptorer [88, 97]. Det kan derfor ikke utelukkes aktivering av NF- κ B, produksjon av inflammatoriske mediatorer og produksjon av ROS etter behandling med PA og HG. Det kunne vært spennende å undersøke effekter av NOD-ligander i humane myotuber sammen med isolerte makrofager som vil gi et reelt bilde *in vivo*. Videre kunne det vært interessant å bruke muskelceller fra personer som har T2D for å få undersøkt uttrykk av NOD-reseptorer og for å studere effekter av NOD-ligander på energimetabolisme i disse muskelcellene.

Dessuten kunne det vært ønskelig å måle lipidmetabolitter (ceramider, DAG) etter inkubering med NOD-ligander. Siden det må gjøres flere forsøk for å avklare effekten av NOD-ligander på insulinresponser, kunne det samtidig vært ønskelig å få undersøkt effekten av NOD-ligander sammen med palmitinsyre på insulinresponser i myotuber. Måling av cytokiner f.eks IL-6, TNF- α , IL-8 og inflammasjonsmediatorer ville vært interessant, og vil si noe om aktivering av inflammasjonsvei. Måle med og uten I κ B kinase(IKK)- [93] og JNK [83] hemmere ville også vært interessant og vil avgjøre om endring i energimetabolismen er avhengig av aktivering av NF- κ B og stress-kinase. Dessuten ville måling av AMPK-aktivitet og ROS produksjon i myotuber etter forbehandling med NOD-ligander vært spennende, og kan være en nøkkel til å forstå resultatene.

5. Konklusjon

Resultatene fra denne studien viste at NOD-ligander hadde effekter både på glukose- og oljesyremetabolisme i dyrkede humane skjelettmuskelceller i kultur. Spesifikke NOD-ligander, C12-iE-DAP (NOD1) og L18-MDP (NOD2) og uspesifikk PGN-ECndi (NOD1/2)-ligand ble benyttet til å måle energimetabolismen. NOD1-ligand reduserte oljesyremetabolisme, mens NOD2-ligand reduserte basal glukosemetabolisme. Begge NOD1- og NOD2-ligander tenderte til å redusere insulinstimulert Akt-fosforylering.

Det trengs imidlertid data fra flere studier for å kunne trekke sikre konklusjoner. Men det viser at NOD1- og NOD2-aktivering modulerer fettsyre- og glukosemetabolisme i dyrkede humane myotuber *in vitro*.

Litteraturliste

1. Sand, O., Sjaastad Øystein V, Haug Egil., *Menneskets fysiologi*. Norway Oslo: Glydendal Norsk Forlag AS, 1st ed. 2001.
2. Rasmussen, B.B. and R.R. Wolfe, *Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle*. Annu Rev Nutr, 1999. **19**: p. 463-84.
3. Delarue, J. and C. Magnan, *Free fatty acids and insulin resistance*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007. **10**(2): p. 142-8.
4. Jeukendrup, A.E., *Regulation of fat metabolism in skeletal muscle*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **967**: p. 217-35.
5. Holloway, G.P., et al., *Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview*. Acta Physiol (Oxf), 2008. **194**(4): p. 293-309.
6. Devaskar, S.U. and M.M. Mueckler, *The mammalian glucose transporters*. Pediatr Res, 1992. **31**(1): p. 1-13.
7. Bryant, N.J., R. Govers, and D.E. James, *Regulated transport of the glucose transporter GLUT4*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(4): p. 267-77.
8. Michelle Furtado, L., V. Poon, and A. Klip, *GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms*. Acta Physiol Scand, 2003. **178**(4): p. 287-96.
9. Stuart, C.A., et al., *Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(5): p. E1067-73.
10. Barnard, R.J. and J.F. Youngren, *Regulation of glucose transport in skeletal muscle*. Faseb j, 1992. **6**(14): p. 3238-44.
11. Abdul-Ghani, M.A. and R.A. DeFronzo, *Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 476279.
12. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
13. Alberts, B., Hopkin et. al., *Essential Cell Biology, 3rd edition.*, ed. T.F.G. Garland Science. New York and London.
14. Randle, P.J., et al., *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. Lancet, 1963. **1**(7285): p. 785-9.
15. Perseghin, G., et al., *Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects*. N Engl J Med, 1996. **335**(18): p. 1357-62.
16. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, *AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern*. Chem Biol, 2012. **19**(10): p. 1222-36.
17. Chen, S.C., et al., *Long-chain polyunsaturated fatty acids amend palmitate-induced inflammation and insulin resistance in mouse C2C12 myotubes*. Food Funct, 2015.
18. Kurth-Kraczek, E.J., et al., *5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle*. Diabetes, 1999. **48**(8): p. 1667-71.
19. Samovski, D., et al., *Regulation of AMPK activation by CD36 links fatty acid uptake to beta-oxidation*. Diabetes, 2015. **64**(2): p. 353-9.
20. Ruderman, N.B., et al., *Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance*. Am J Physiol, 1999. **276**(1 Pt 1): p. E1-e18.
21. Li, C. and B.B. Zhang, *Insulin signaling and action: glucose, lipids, protein*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000, MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA).

22. Jensen, J., et al., *The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise*. Front Physiol, 2011. **2**: p. 112.
23. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
24. Martins, A.R., et al., *Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function*. Lipids Health Dis, 2012. **11**: p. 30.
25. Lizcano, J.M. and D.R. Alessi, *The insulin signalling pathway*. Curr Biol, 2002. **12**(7): p. R236-8.
26. Saltiel, A.R., *Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 163-4.
27. Tamrakar, A.K., et al., *NOD2 activation induces muscle cell-autonomous innate immune responses and insulin resistance*. Endocrinology, 2010. **151**(12): p. 5624-37.
28. Schertzer, J.D., et al., *NOD1 activators link innate immunity to insulin resistance*. Diabetes, 2011. **60**(9): p. 2206-15.
29. Maurya, C.K., et al., *NOD2 activation induces oxidative stress contributing to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle cells*. Free Radic Biol Med, 2015. **89**: p. 158-169.
30. Tumova, J., M. Andel, and J. Trnka, *Excess of free fatty acids as a cause of metabolic dysfunction in skeletal muscle*. Physiol Res, 2015.
31. Papaetis, G.S., P. Papakyriakou, and T.N. Panagiotou, *Central obesity, type 2 diabetes and insulin: exploring a pathway full of thorns*. Arch Med Sci, 2015. **11**(3): p. 463-82.
32. Boden, G., *Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2003. **111**(3): p. 121-4.
33. Rachek, L.I., *Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2014. **121**: p. 267-92.
34. Konner, A.C. and J.C. Bruning, *Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(1): p. 16-23.
35. Kraegen, E.W. and G.J. Cooney, *Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance*. Curr Opin Lipidol, 2008. **19**(3): p. 235-41.
36. Tateya, S., F. Kim, and Y. Tamori, *Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance*. Front Endocrinol (Lausanne), 2013. **4**: p. 93.
37. Steinberg, G.R., et al., *Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling*. Cell Metab, 2006. **4**(6): p. 465-74.
38. Hotamisligil, G.S., et al., *IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance*. Science, 1996. **271**(5249): p. 665-8.
39. Jin, C., J. Henao-Mejia, and R.A. Flavell, *Innate immune receptors: key regulators of metabolic disease progression*. Cell Metab, 2013. **17**(6): p. 873-82.
40. Tremaroli, V. and F. Backhed, *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 242-9.
41. Bloch-Damti, A. and N. Bashan, *Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(11-12): p. 1553-67.

42. Prajapati, B., et al., *Understanding and modulating the Toll like Receptors (TLRs) and NOD like Receptors (NLRs) cross talk in type 2 diabetes*. Curr Diabetes Rev, 2014. **10**(3): p. 190-200.
43. Helsedirektoratet, *Nasjonale faglige retningslinjer: Diabetes - forebygging, diagnostikk og behandling*, Helsedirektoratet, Editor. 2009.
44. Russo, G.T., et al., *Factors associated with beta-cell dysfunction in type 2 diabetes: the BETADECLINE study*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e109702.
45. Butler, A.E., et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. Diabetes, 2003. **52**(1): p. 102-10.
46. Meigs, J.B., *Epidemiology of type 2 diabetes and cardiovascular disease: translation from population to prevention: the Kelly West award lecture 2009*. Diabetes Care, 2010. **33**(8): p. 1865-71.
47. World health, O. *Diabetes. 2015 (cited 14.09.15) Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>*.
48. Khunti, K., et al., *Physical activity and sedentary behaviours of South Asian and white European children in inner city secondary schools in the UK*. Fam Pract, 2007. **24**(3): p. 237-44.
49. Amar, J., et al., *Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment*. EMBO Mol Med, 2011. **3**(9): p. 559-72.
50. Cani, P.D. and N.M. Delzenne, *The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(13): p. 1546-58.
51. Cani, P.D. and N.M. Delzenne, *Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(6): p. 737-43.
52. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
53. Kootte, R.S., et al., *The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Obes Metab, 2012. **14**(2): p. 112-20.
54. AAs, V., et al., *Tarmfloraen- på helsa løs*. Vitenskap nft Farmatid, 2015: p. 26-30.
55. Royet, J., D. Gupta, and R. Dziarski, *Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 837-51.
56. Cox, A.J., N.P. West, and A.W. Cripps, *Obesity, inflammation, and the gut microbiota*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015. **3**(3): p. 207-15.
57. Greiner, T. and F. Backhed, *Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis*. Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(4): p. 117-23.
58. Tilg, H. and T.E. Adolph, *Influence of the human intestinal microbiome on obesity and metabolic dysfunction*. Curr Opin Pediatr, 2015.
59. Flint, H.J., *Obesity and the gut microbiota*. J Clin Gastroenterol, 2011. **45 Suppl**: p. S128-32.
60. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
61. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
62. Ridaura, V.K., et al., *Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice*. Science, 2013. **341**(6150): p. 1241214.
63. Backhed, F., et al., *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 979-84.

64. Rabot, S., et al., *Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism*. *Faseb j*, 2010. **24**(12): p. 4948-59.
65. Membrez, M., et al., *Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice*. *Faseb j*, 2008. **22**(7): p. 2416-26.
66. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. *Diabetes*, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
67. Vrieze, A., et al., *Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome*. *Gastroenterology*, 2012. **143**(4): p. 913-6.e7.
68. Meylan, E., J. Tschoopp, and M. Karin, *Intracellular pattern recognition receptors in the host response*. *Nature*, 2006. **442**(7098): p. 39-44.
69. Franchi, L., et al., *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors: Intracellular Pattern Recognition Molecules for Pathogen Detection and Host Defense*. *The Journal of Immunology*, 2006. **177**(6): p. 3507-3513.
70. Benetti, E., et al., *The NLRP3 Inflammasome as a novel player of the intercellular crosstalk in metabolic disorders*. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 678627.
71. Lee, J.Y., L. Zhao, and D.H. Hwang, *Modulation of pattern recognition receptor-mediated inflammation and risk of chronic diseases by dietary fatty acids*. *Nutr Rev*, 2010. **68**(1): p. 38-61.
72. Zhong, Y., A. Kinio, and M. Saleh, *Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 333.
73. Inohara, N., et al., *Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(21): p. 14560-7.
74. Shaw, M.H., et al., *NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(4): p. 377-82.
75. Rietdijk, S.T., et al., *Sensing intracellular pathogens-NOD-like receptors*. *Curr Opin Pharmacol*, 2008. **8**(3): p. 261-6.
76. Carneiro, L.A., et al., *Nod-like proteins in inflammation and disease*. *J Pathol*, 2008. **214**(2): p. 136-48.
77. Correa, R.G., S. Milutinovic, and J.C. Reed, *Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases*. *Biosci Rep*, 2012. **32**(6): p. 597-608.
78. Prieto, P., et al., *NOD1 receptor is up-regulated in diabetic human and murine myocardium*. *Clin Sci (Lond)*, 2014. **127**(12): p. 665-77.
79. Zhao, L., et al., *NOD1 activation induces proinflammatory gene expression and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. **301**(4): p. E587-98.
80. Zhou, Y.J., et al., *Increased NOD1, but not NOD2, activity in subcutaneous adipose tissue from patients with metabolic syndrome*. *Obesity (Silver Spring)*, 2015. **23**(7): p. 1394-400.
81. Shiny, A., et al., *Convergence of innate immunity and insulin resistance as evidenced by increased nucleotide oligomerization domain (NOD) expression and signaling in monocytes from patients with type 2 diabetes*. *Cytokine*, 2013. **64**(2): p. 564-70.
82. Yi-Jun, Z., et al., *Nucleotide-binding oligomerization domain-1 ligand induces inflammation and attenuates glucose uptake in human adipocytes*. *Chin Med Sci J*, 2012. **27**(3): p. 147-52.

83. Zhou, Y.J., et al., *NOD1 activation induces innate immune responses and insulin resistance in human adipocytes*. *Diabetes Metab*, 2012. **38**(6): p. 538-43.
84. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(4): p. 961-7.
85. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
86. Jensen, E.C., *The basics of western blotting*. *Anat Rec (Hoboken)*, 2012. **295**(3): p. 369-71.
87. Tse, K. and A.A. Horner, *Update on toll-like receptor-directed therapies for human disease*. *Ann Rheum Dis*, 2007. **66 Suppl 3**: p. iii77-80.
88. Zhao, L., et al., *Differential modulation of Nods signaling pathways by fatty acids in human colonic epithelial HCT116 cells*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(16): p. 11618-28.
89. Aas, V., et al., *Are cultured human myotubes far from home?* *Cell Tissue Res*, 2013. **354**(3): p. 671-82.
90. Al-Khalili, L., et al., *Insulin action in cultured human skeletal muscle cells during differentiation: assessment of cell surface GLUT4 and GLUT1 content*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60**(5): p. 991-8.
91. Sarabia, V., et al., *Glucose transport in human skeletal muscle cells in culture. Stimulation by insulin and metformin*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(4): p. 1386-95.
92. Nehlin, J.O., et al., *Human myotubes from myoblast cultures undergoing senescence exhibit defects in glucose and lipid metabolism*. *Biogerontology*, 2011. **12**(4): p. 349-65.
93. Frisard, M.I., et al., *Toll-like receptor 4 modulates skeletal muscle substrate metabolism*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010. **298**(5): p. E988-98.
94. Frisard, M.I., et al., *Low levels of lipopolysaccharide modulate mitochondrial oxygen consumption in skeletal muscle*. *Metabolism*, 2015. **64**(3): p. 416-27.
95. Hulver, M.W., et al., *Skeletal muscle lipid metabolism with obesity*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **284**(4): p. E741-7.
96. Blaak, E.E., et al., *Plasma FFA utilization and fatty acid-binding protein content are diminished in type 2 diabetic muscle*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000. **279**(1): p. E146-54.
97. Huang, S., et al., *Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways*. *J Lipid Res*, 2012. **53**(9): p. 2002-13.
98. Aas, V., et al., *Chronic hyperglycemia reduces substrate oxidation and impairs metabolic switching of human myotubes*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1812**(1): p. 94-105.
99. Aas, V., et al., *Chronic hyperglycaemia promotes lipogenesis and triacylglycerol accumulation in human skeletal muscle cells*. 2004/08/17 ed. *Diabetologia*. Vol. 47. 2004. 1452-61.
100. Holloway, G.P., A. Bonen, and L.L. Spriet, *Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals*. *Am J Clin Nutr*, 2009. **89**(1): p. 455s-62s.
101. Aas, V., et al., *Electrical stimulation improves insulin responses in a human skeletal muscle cell model of hyperglycemia*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **967**: p. 506-15.
102. McIntyre, E.A., et al., *Cultured muscle cells from insulin-resistant type 2 diabetes patients have impaired insulin, but normal 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside-stimulated, glucose uptake*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(7): p. 3440-8.

103. Krook, A., et al., *Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects*. Diabetes, 1998. **47**(8): p. 1281-6.
104. Kase, E.T., et al., *Primary defects in lipolysis and insulin action in skeletal muscle cells from type 2 diabetic individuals*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(9): p. 1194-201.
105. Jove, M., et al., *Palmitate induces tumor necrosis factor-alpha expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-kappaB activation*. Endocrinology, 2006. **147**(1): p. 552-61.
106. Bonnard, C., et al., *Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 789-800.
107. Nishikawa, T. and E. Araki, *Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(3): p. 343-53.

Vedlegg / Appendiks

1. Medier til celledyrking

1.1 Utsåingsmedium

500 ml DMEM m / GLUTAMAX m/ 1,0 g/L glukose

50 ml FCS (Foetal Calf Serum)

2,5 ml Penicillin/ Streptomycin 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone[®] (250µg/ml Amfotericin)

1.2 Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM m / GLUTAMAX m/ 1,0 g/L glukose

10 ml FCS (Foetal Calf Serum)

10 ml Ultroser G

2,5 ml Penicillin / Streptomycin 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone[®] (250µg/ml Amfotericin)

1.3 Differensieringsmedium

500 ml DMEM m / GLUTAMAX m/ 1,0 g/L glukose

10 ml FCS (Foetal Calf Serum)

2,5 ml Penicillin / Streptomycin 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone[®] (250µg/ml Amfotericin)

25 pmol insulin

1.4 SkGM- dyrkningsmedium

500 ml SkBM Basal medium (Lonza®)

10 ml FCS (Foetal Calf Serum)

2,5 ml Penicillin / Streptomycin 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone® (250µg/ml Amfotericin)

5,0 ml L-glutamin (200mM)

SkGM SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (0,5 ml human Epidermal Growth Factor (hEGF), 5 ml Fetuin, 0,5 ml Dexamethasone, 0,5 ml GA-1000, 5 ml BSA (Bovint serumalbumin))

1.5 Frysemedium (per ml)

0,25 ml SkGM

0,25 ml FCS/FBS

0,5 ml 20 % DMSO

2. Medier til substratoksidasjonsmetoden

2.1 Radioaktiv glukose (200µM)

200µM D-[¹⁴ C(U)] glukose (0,58µCi/ml)

200µM varm glukose tilsvarende 0,58µCi/ml (100µCi/ml, 2,9mCi/mmol)

For 80 brønner i et 96-brønners brett :

20µl av 2,4mM BSA

28 µl varm glukose

4,8 ml Dulbeccos PBS m/ 4-(2-hydroksyetyl)-1-pipereazinetansulfonsyre (20 mM HEPES) PH=7,2 til total volum på 4,8 ml.

2.2 Radioaktiv oljesyre (OA) (100µM)

100µM -[1-¹⁴ C] oljesyre (1µCi/ml)

18µM varm oljesyre tilsvarer 1µCi/ml (100µCi/ml, 56,3mCi/mmol)

82µM kald oljesyre (ikke radioaktiv oljesyre)

For 80 brønner i et 96-brønners brett :

66 µl 6mM kald OA

48 µl varm OA

14,5 µl 2,4mM BSA

4,8 µl 1M L-karnitin

4,7 ml Dulbeccos PBS m /20 mM HEPES PH=7,2 til total volum på 4,8ml.

2.3 Andre medier

10×PBS (vaskebuffer)

80 g NaCl

2 g KH₂PO₄

29 g Na₂HPO₄ 2 H₂O

2 g KCl

ad. 1L destillert H₂O

PH justeres til 7,2 -7,4 med 1M H₂SO₄

3. Medier til Western blotting

3.1 2 x Laemmli buffer (Sample buffer)

12,5 ml 0,5 M Tris -HCl pH 6,8

10 ml 100% Glyserol

20 ml 10 % SDS

ad destillert vann opptil 50 ml

10 µl/ml proteasehemmer og fosfatasehemmer

Andre reagenser

10 % beta-merkaptoetanol

5 % bromfenolblått

3.2 T-TBS (Tween-TBS)

10 mM Tris

100 mM NaCl

PH justeres til 7,5

0,05% Tween 20

3.3 Blottebuffer

25 mM Tris

192 mM Glysin

20% metanol (v/v)

PH= 8,3

3.4 Blotto

5 % tørrmelk i T-TBS

3.5 Elektroforesebuffer (Bio-Rad)

25 mM Tris

192 mM Glysin

0,1 % (w/v) SDS

PH= 8,3.